



**Ana Filipa Machado
Fradinho**

**Fisiologia e perfil metabólico de plantas de
Moringa oleifera e *Eucalyptus globulus*
sujeitas a alterações climáticas**

**Physiology and metabolic profile of *Moringa
oleifera* and *Eucalyptus globulus* plants
subjected to climate changes**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Ana Filipa Machado
Fradinho

**Fisiologia e perfil metabólico de plantas de
Moringa oleifera e *Eucalyptus globulus*
sujeitas a alterações climáticas**

**Physiology and metabolic profile of *Moringa
oleifera* and *Eucalyptus globulus* plants
subjected to climate changes**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Celeste Pereira Dias (Investigadora de Pós-Doutoramento do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra e QOPNA da Universidade de Aveiro), da Professora Doutora Maria da Conceição Lopes Vieira dos Santos (Professora Catedrática do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto) e da Professora Doutora Diana Cláudia Gouveia Alves Pinto (Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro).

Apoio de financiamento:



“We convince ourselves that life will be better after we get married, have a baby, then another.

Then we are frustrated that the kids aren't old enough, and we'll be more content when they are.

After that, we're frustrated that we have teenagers to deal with.

We will certainly be happy when they are out of that stage.

We tell ourselves that our life will be complete when our partner gets his or her act together when we get a nicer car, are able to go on a nice holiday, when we retire.

The truth is, there's no better time to be happy than right now. If not now, when?

Your life will always be filled with challenges.

It's best to admit this to yourself and decide to be happy anyway.

A quote comes from Alfred D. Souza. He said: "For a long time it had seemed to me that life was about to begin - real life. But there was always some obstacle in the way, something to be gotten through first, some unfinished business, time still to be served, or a debt to be paid. Then life would begin. At last it dawned on me that these obstacles were my life."

This perspective has helped me to see that there is no way to happiness. Happiness is the way.

So, treasure every moment that you have and treasure it more because you shared it with someone special, special enough to spend your time...and remember that time waits for no one.

So, stop waiting until you lose ten pounds, until you gain ten pounds, until you have kids, until your kids leave the house, until you start work, until you retire, until you get married, until you get divorced, until Friday night, until Sunday morning, until you get a new car or home, until your car or home is paid off, until spring, until summer, until winter, until your song comes on, until you've had a drink.... there is no better time than right now to be happy.

Happiness is a journey, not a destination.

Work like you don't need money,

Love like you've never been hurt,

And dance like no one's watching.”

Robert Westerburg

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Arguente

Doutora Maria Paula do Amaral Alegria Guedes de Pinho
Investigadora Auxiliar, Laboratório Associado UCIBIO@REQUIMTE - Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto

Orientador

Doutora Maria Celeste Pereira Dias
Investigadora de Pós-Doutoramento, Centro de Ecologia Funcional, Universidade de Coimbra e QOPNA, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar um especial e sincero agradecimento às orientadoras desta tese de mestrado, a Professora Dr. Diana Pinto, a Professora Dr. Conceição Santos e a Dr. Celeste Dias. Agradeço toda a disponibilidade, paciência, dedicação, tranquilidade, confiança e amizade que demonstraram para comigo ao longo deste trabalho. Sem dúvida que aprendi bastante como todos os conhecimentos que me transmitiram, tanto a nível científico como a nível pessoal.

Um especial agradecimento à Dr. Paula Guedes e ao Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto por me terem recebido tão bem e contribuírem para o enriquecimento do meu trabalho. Obrigada Ana Margarida e Isabel Calejo por toda a paciência que tiveram comigo!

À Dr. Ana Seca, professora auxiliar do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento da Universidade dos Açores e à Dr. Mónica Válega agradeço a disponibilidade e a ajuda que me foi tão importante na análise cromatográfica.

À Professora Dr. Amparo Faustino, ao Professor Dr. Mário Simões, Professor Dr. Artur Silva e à professora Dr. Maria de Lourdes pela disponibilidade, compreensão, atenção e amizade que sempre me transmitiram, especialmente quando alguma coisa corria menos bem.

Ao Departamento de Química por me ter recebido e acolhido tão bem.

Ao grupo de investigação do Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais da Universidade de Aveiro agradeço os ensinamentos laboratoriais e ajuda que me disponibilizaram sempre que necessário. Um especial obrigado à Sara Tomé e à Djenisa Rocha.

Aos investigadores do Laboratório de Biotecnologia e Citómica da Universidade de Aveiro quero agradecer o espírito de equipa, o respeito e o bom ambiente.

Ao Ministério da Educação de Timor-Leste por ceder as sementes de Moringa, em especial à Maria da Costa.

Aos meus colegas de mestrado agradeço toda a compreensão e entreajuda que partilhámos durante estes dois anos, em especial à Márcia, à Carina e à Telma.

Aos meus amigos, que acreditaram em mim e estiveram sempre comigo nos bons e maus momentos. Apesar da distância sabem que estão sempre no meu coração, obrigada Lili, Cláudia Martins, Catarina Reigota, Catarina Ribeiro e Mónica.

A toda a minha família agradeço pelo incentivo, apoio, carinho e compreensão que me transmitem incondicionalmente. Um agradecimento especial aos meus avós.

Aos meus pais pelo amor, compreensão, amizade, força, apoio e conforto que me proporcionaram sempre ao longo desta caminhada. Obrigada pelas oportunidades e incentivo no sentido de alcançar sempre os meus objetivos e seguir os meus sonhos.

Por fim, mas não menos importante, àquela pessoa especial que me compreende e me atura nas alturas de maior desespero. Obrigada pelo amor, força, carinho e respeito que me dás todos os dias, incondicionalmente...!

Palavras-chave

Fotossíntese, compostos voláteis, análise GC/MS, radiação UVB, déficit hídrico

Resumo

As alterações climáticas emergentes têm um grande impacto no crescimento e desenvolvimento de espécies florestais, nomeadamente em espécies de valor industrial e medicinal, como é o caso do eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e da moringa (*Moringa oleifera*). Assim, é urgente conhecer as respostas fisiológicas e entender as variações que ocorrem nos perfis metabólicos de espécies vegetais.

Neste trabalho, plantas jovens de *Eucalyptus globulus* foram expostas a radiação UVB (12kJ/m²) e foram avaliadas as respostas fisiológicas e o perfil metabólico, um e onze dias após a aplicação da radiação. A dose de UVB usada não afetou as reações fotoquímicas nem as trocas gasosas, contudo ao nível do metabolismo do carbono (AST e amido) e do conteúdo de pigmentos verificaram-se pequenas alterações (AST e pigmentos). Através da análise do perfil metabólico de *E. globulus* foram encontrados compostos voláteis e semi-voláteis pertencentes às famílias dos terpenos, sesquiterpenos e aldeídos. Em geral, os sesquiterpenos e os álcoois monoterpénicos apresentaram uma tendência para manter e, em alguns casos, diminuir com o stress, enquanto que o grupo dos aldeídos aumentou e os monoterpénicos apresentaram um comportamento mais heterogéneo. O *E. globulus* mostrou ser uma espécie tolerante à aplicação da dose de UVB usada neste trabalho.

Por outro lado, plantas jovens de *M. oleifera* foram expostas a déficit hídrico (DH). Um grupo de plantas foi recolhido um dia após o final da exposição e o outro grupo após onze dias do final da exposição. Foi avaliado o perfil metabólico desta espécie através de GC/MS. Os dados cromatográficos indicaram que em condições de stress (DH(1) e DH(11)), as quantidades de compostos associados a vias primárias e secundárias de defesa (como os alcanos, álcoois, ácidos carboxílicos, esteróis, aminoácidos e açúcares) sofreram algumas alterações. As plantas analisadas 11 dias após a remoção do stress mostraram maiores variações do perfil de metabolitos. No entanto, tanto um como onze dias após a remoção do stress, as plantas apresentaram a formação de novos rebentos. Apesar do perfil de metabolitos ter sofrido algumas alterações, por não se registarem casos de morte, conclui-se que as plantas de moringa mostraram ser tolerantes aos tratamentos aplicados.

Keywords

Photosynthesis, volatile compounds, GC/MS analysis, UVB radiation, drought stress

Abstract

The emerging climate change scenarios have a major impact on growth and development of forest species, including those with industrial and medicinal value, such as eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) and drumstick (*Moringa oleifera*). Thus, it is urgent to know the physiological responses and understand the changes that occur in metabolic profiles of the most affected species.

Young plants of *E. globulus* were exposed to UVB radiation. The physiological and metabolic responses were evaluated 1 day and 11 days after the end of the stress application. The UVB dose (12kJ/m²) used did not affect nor the photochemical reactions nor the gas exchange, but the carbon metabolism (TSS and starch), and pigment content showed small changes that remained until 11 days after the end of stress exposure (TSS and pigments). Through the metabolic profile analysis of *E. globulus* were found volatile and semi-volatile compounds belonging to the families of terpenes, sesquiterpenes, alcohols and aldehydes. In general, monoterpene alcohols and sesquiterpenes were tend to maintain and, in some cases, to reduce under stress conditions, while monoterpene and aldehydes increased and showed a more heterogeneous behaviour. The *E. globulus* showed some tolerance to the UVB dose tested in this study.

By the other hand, young plants of *M. oleifera* were exposed to other stress, water deficit (DH). One group of plants was collected one day after the end of stress exposure and the other group eleven days after of the end of exposure. The metabolic profile was evaluated by GC/MS. In stress conditions (DH (1) and DH (11)), the chromatographic data indicate that the amounts of compounds associated with primary and secondary defense pathways (like alkanes, alcohols, carboxylic acids, sterols, aminoacids and sugars) have been changed. Eleven days after the end of the stress, the plants showed higher variations of the metabolic profile. However, either one or eleven days after the removal of stress, plants showed new shoots. Despite the metabolic profile have changed and considering that DH did not induced plant death, it is concluded that *M. oleifera* plants have tolerance to the treatment applied.

Índice

Capítulo 1 – Introdução geral	1
1.1. Alterações climáticas	1
1.1.1. Camada de ozono e radiação ultravioleta	4
1.1.2. Seca e degradação de solos	6
1.2. Impacto das alterações climáticas em plantas: o caso de espécies florestais	7
1.2.1. Efeitos do défice hídrico e da radiação UVB em plantas	9
a) Défice hídrico	9
b) Radiação UVB	10
1.2.2. Parâmetros usados na avaliação do efeito do défice hídrico e radiação UVB em plantas	12
1.3. Espécies selecionadas	15
1.3.1. <i>Eucalyptus globulus</i>	15
a) Caracterização da espécie	15
b) Importância económica e social	16
1.3.2. <i>Moringa oleifera</i>	17
a) Caracterização da espécie	17
b) Usos e propriedades medicinais	18
Capítulo 2 – Objetivos	23
Capítulo 3 – Resposta do <i>Eucalyptus globulus</i> à radiação UVB	25
3.1. Resumo	27
3.2. Introdução	27
3.3. Materiais e Métodos	30
3.3.1. Condições de cultura e exposição à radiação UVB	30
a) Condições de cultura	30
b) Exposição à radiação UVB	31
3.3.2. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
a) Determinação das trocas gasosas	31
a) Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i>	32
3.3.3. Quantificação da clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> e carotenoides	32
3.3.4. Quantificação de açúcares solúveis totais (AST)	33
3.3.5. Quantificação de amido	33
3.3.6. Análise de dados	34

3.3.7. Análise do perfil de voláteis	34
3.3.7.1. Fibras de micro extração em fase sólida (SPME)	34
3.3.7.2. Extração HS-SPME-GC-IT/MS	34
3.3.7.3. Análise de dados do perfil de voláteis.....	35
a) Análise multivariada ‘untargeted’	35
b) Análise estatística univariada	36
3.4. Resultados	37
3.4.1. Análises fisiológicas.....	37
3.4.1.1. Pigmentos fotossintéticos	37
3.4.1.2. Concentração de hidratos de carbono	38
3.4.1.3. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i>	39
3.4.2. Análise do perfil volátil.....	40
3.4.2.1. Terpenos.....	40
3.4.2.2. Sesquiterpenos.....	43
3.4.2.3. Aldeídos	45
3.5. Discussão	45
3.5.1. Análises fisiológicas	45
3.5.2. Perfil de voláteis	48
3.6. Conclusões gerais	54
Capítulo 4 – Resposta da <i>Moringa oleifera</i> face ao défice hídrico	55
4.1. Resumo.....	57
4.2. Introdução	57
4.3. Materiais e Métodos	60
4.3.1. Condições de cultura e exposição ao stress	60
a) Condições de cultura	60
b) Exposição ao défice hídrico	60
4.3.2. Obtenção dos extratos	61
4.3.3. Preparação das amostras para análise por GC/MS	61
4.3.4. Preparação dos padrões.....	61
4.3.5. Análise dos metabolitos em GC/MS.....	62
4.4. Resultados	64
4.4.1. Aspeto geral das plantas	64
4.4.2. Perfil de metabolitos	65
4.5. Discussão	69
4.6. Conclusões gerais	72

Capítulo 5 – Considerações finais	77
Capítulo 6 – Referências bibliográficas.....	81
Capítulo 7 – Anexos	97

Abreviações

$(C_5H_8)_n$ – Fórmula geral do isopreno

μA – microamperes

μl – microlitros

$\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ – micromoles por metro quadrado por segundo

μs – microsegundos

A – Taxa de Assimilação de CO_2

ABA – Ácido abscísico

AOS – Aleno Óxido Síntase

ASCII – Código Padrão Americano para o Intercâmbio de Informação, do inglês American Standard Code for Information Interchange

AST – Açúcares solúveis totais, do inglês TSS, Total Soluble Sugars

BSTFA – Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida

C – Controlo

CE-MS – Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa, do inglês Capillary electrophoresis-mass spectrometry

CFC's – Clorofluorocarbonetos

CH_4 – Metano

CH_2Cl - Diclorometano

C_i/C_a – Rácio entre a concentração intercelular de CO_2 e a concentração intracelular de CO_2

cm – centímetro

CO_2 – Dióxido de carbono

CPD's – Cyclobutane Pyrimidine Dímer

Cwx – Carbowax

DH – Défice hídrico

DMAPP – Dimethylallyl diphosphate

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês Deoxyribonucleic Acid

DXP – Deoxyxylulose-5- phosphate

E – Taxa de Transpiração

EI – Impacto eletrónico, do inglês Electron Ionization

F_o – Fluorescência mínima

FPP – Farnesyl pyrophosphate

F_v/F_m – Eficiência máxima do fotossistema II

GC – Cromatografia gasosa, do inglês Gas Chromatography

GEE – Gases de efeito de estufa

GGPP – Geranylgeranyl pyrophosphate

GPP – Geranyl pyrophosphate

gs – Condutância Estomática

h – hora

He – Hélio

HPL – Hidroperóxido Liase

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High Performance Liquid Chromatography

HS – Espaço vazio, do inglês headspace

IEA – Agencia internacional de energia, do inglês International Energy Agency

IPP – Isopentenyl diphosphate

IT – Armadilha de iões, do inglês Ion Trap

$\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ – kilojoule por metro quadrado por dia

m – metro

m/z – Razão massa/carga

MAMAOT – Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território

MDA – Malondialdeído

mm – milímetro

MS – Espectrometria de massa, do inglês Mass Spectrometry

N_2O – Óxido nítrico

NaOCl – Hipoclorito de sódio

nm – nanómetro

°C – graus Celsius

P – Probabilidade estatística

PA – Poliacrilato

PF – Peso Fresco

pH – escala numérica usada para especificar acidez ou alcalinidade

PI – Padrão interno

PLS-DA – Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais, do inglês Partial least squares Discriminant Analysis

PSII – Fotossistema II, do inglês Photosystem II

Q² – Quartil 2 (coincide com a mediana)

R² – Coeficiente de Determinação

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês Reactive Oxygen Species

rpm – rotações por minuto

RuBisCO – Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase /oxigenase

S1 – Amostras recolhidas 1 dia após o final da exposição

S11 – Amostras recolhidas 11 dias após o final da exposição

scan/s – Scan por segundo

SNC – Sistema Nervoso Central

SPME – Micro Extração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Micro Extraction

TLC – Cromatografia em camada fina, do inglês Thin Layer Chromatography

TMSCI – Cloreto de trimetilsililo

ToF – Detetor de tempo de voo, do inglês Time of Flight

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

UVB_H – Dose mais elevada de UVB, do inglês High

UVB_L – Dose mais baixa de UVB, do inglês Low

UVC – Ultravioleta C

UVR8 – UV-B resistance *locus* 8

VIP – Índice de importância das variáveis, do inglês *Variable Importance Plot*

VOC's – Compostos Orgânicos Voláteis, do inglês Volatile Organic Compounds

W/m² – watt por metro quadrado

WMO – Organização mundial da meteorologia, do inglês World Meteorological Organization

ΦPSII – Eficiência efetiva do Fotossistema II

Parte dos resultados apresentados nesta dissertação foram submetidos e/ou publicados em revistas internacionais como artigos:

a) Eucalyptus globulus: Fradinho et al. 2016 – stress UV (EEB)

b) Moringa oleifera: Fradinho et al. 2016 – stress hídrico (JPP)

Fradinho et al. 2016 – stress UV (PBP)

Capitulo 1

Introdução geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS

Atualmente, as alterações climáticas são a maior ameaça ambiental do século XXI, esperando atingir mais fortemente as regiões dos trópicos e subtópicos (África e América do Sul) (Beaumont et al. 2011). Ao longo de milhares de milhões de anos de existência do planeta, sabe-se que o clima nunca foi constante e equilibrado, no entanto, nos últimos anos as alterações climáticas tomaram proporções caóticas conduzindo a futuras alterações globais drásticas na biodiversidade (Pereira et al. 2010).

Uma pesquisa realizada por Rahmstorf et al. (2012) indica que as grandes oscilações no clima podem ocorrer devido a causas naturais (ex.: variabilidade solar, erupções vulcânicas, El Niño) ou a causas humanas como é o caso da emissão dos gases de efeito de estufa. Entre as várias atividades humanas que produzem gases de efeito de estufa, o uso de energia corresponde à maior fonte de emissões (CO_2). A agricultura liberta essencialmente CH_4 e N_2O (provenientes do gado e cultivo de arroz) em quantidades muito baixas. A indústria contribui apenas com 6% de emissões de gases fluorados e N_2O (Figura 1) (IPCC 2007, IEA 2014).

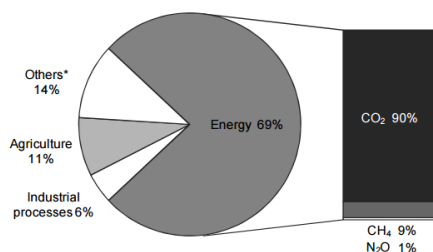


Figura 1 - Emissões antropogénicas globais: Sectores responsáveis pela emissão de gases de efeito de estufa (GEE). Retirado de IEA, 2014.

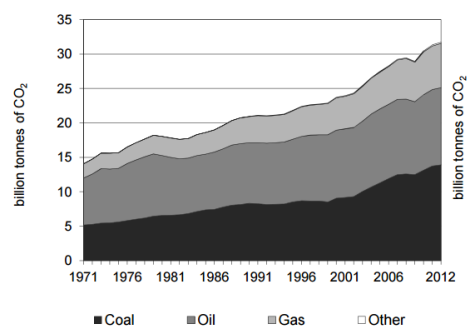


Figura 2 - Emissões mundiais de CO_2 pelos combustíveis fósseis. Retirado de IEA, 2014.

As emissões de gases de efeito de estufa tornam-se mais frequentes devido à sucessiva queima de combustíveis fósseis como o carvão, petróleo e gás natural. Através de dados apresentados pela "International Energy Agency" (IEA) em 2012, 80% da energia primária mundial deriva de combustíveis fósseis, onde 32.8% corresponde ao petróleo, 27.2% ao carvão e 20.9% ao gás natural (Figura 2). Porém, apenas 0.8% da energia primária mundial deriva de energias alternativas como a energia geotérmica, solar e eólica (IPCC, 2011).

As emissões de gases de efeitos de estufa que levam ao aquecimento global e alterações climáticas sucessivas estão inteiramente ligadas à utilização e produção de energia fóssil. No entanto, as mudanças climáticas de origem antropogénica são um problema que ocorre pela

combinação de três parâmetros: energia, economia e ambiente. A energia é essencial para o crescimento económico e consequentemente a evolução da sociedade. Contudo, isto acarreta a libertação de grandes quantidades de gases de efeito de estufa. Assim, é uma prioridade começar a avaliar estes parâmetros simultaneamente para que no futuro as estratégias de mitigação apresentem resultados favoráveis (Höök e Tang 2013). Por outro lado, Buckeridge et al. (2007) defendem que mais importante que favorecer a economia é o modo como um ecossistema sustentável contribui para a manutenção e equilíbrio da biodiversidade.

Ondas de calor, secas, inundações, degelo e subida do nível médio das águas do mar são fenómenos cada vez mais frequentes que levam a impactos diretos na agricultura, o que posteriormente se torna uma ameaça para as economias mundiais (Avnery et al. 2011). Outro fenómeno preocupante que tem vindo a causar danos no clima é o caso da desflorestação mundial (Figura 3), especialmente na Amazónia, pois tem-se verificado um aumento da quantidade de gases de efeito de estufa na atmosfera (Coe et al. 2013). Outros autores referem que a desflorestação e fragmentação das florestas podem acelerar as mudanças climáticas através do aquecimento da superfície, diminuindo os níveis de precipitação e modificando os microclimas (Buckeridge et al. 2007, Lawrence e Vandecar 2015).

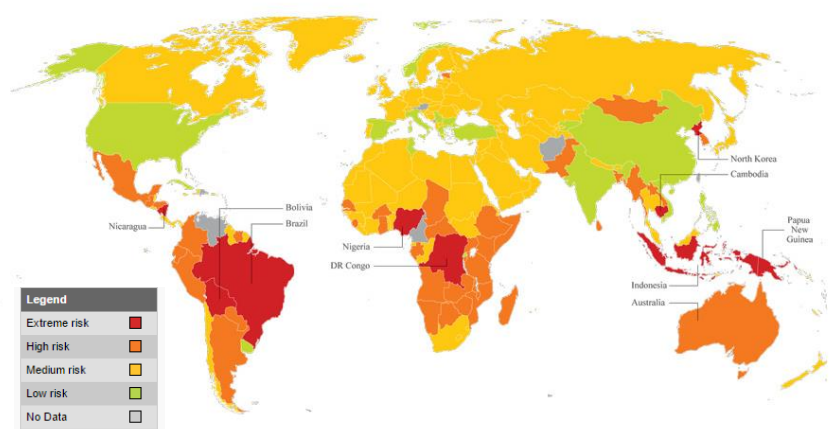


Figura 3 - Índice de desflorestação mundial (2012). Retirado de Maplecroft's Climate Change and Environmental Risk Atlas 2012.

Alterações no desempenho agrícola podem resultar de interações com outros organismos tais como herbívoros e parasitismo e são denominados de fatores bióticos. Quando as culturas são influenciadas por aspetos físico-químicos do meio ambiente (temperatura, humidade, fornecimento de água e minerais, intensidade de luz) que põem em causa o seu crescimento e desenvolvimento são designados por fatores abióticos (Schulze et al. 2005).

Cada espécie vegetal apresenta condições ótimas de crescimento, no entanto apenas em estufa é possível controlar e satisfazer essas necessidades. Na Natureza, as plantas encontram-

se sujeitas a uma grande quantidade de variantes que podem atuar em simultâneo comprometendo a sobrevivência das culturas. Entender a forma como as plantas são afetadas tanto ao nível interno como externo facilita a preservação e evolução das espécies (Ceccarelli et al. 2010).

O setor agroflorestal pode contribuir para a proteção de solos face a riscos de erosão (ajudar na preservação do solo, no aumento de matéria orgânica, entre outros), aspeto que pode ser afetado pelas alterações climáticas comprometendo a fertilidade do solo, desenvolvimento de comunidades microbianas e a regulação hidrológica (MAMAOT 2013). Por exemplo, o relatório de 2013 do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e Ordenamento do Território (MAMAOT) refere que *“o aumento da temperatura associado a condições de maior secura terá como consequência a diminuição do input de matéria orgânica, que decorre da menor produção de biomassa e o aumento da taxa de mineralização, o que, em solos já de si vulneráveis, potenciará a erosão e os processos de desertificação (página 24).”* Desta forma, uma das estratégias que visa na adaptação do ecossistema agrícola e florestal às atuais oscilações do clima é a conservação da fertilidade do solo (impedindo que ocorram fenómenos de erosão hídrica e aumentando o teor de matéria orgânica no solo).

Uma vez que o setor agroflorestal é a grande força motriz de suplemento de alimentos e matéria-prima face ao crescente aumento da população, torna-se assim crucial não só considerar práticas sustentáveis que minimizem a pressão deste setor na natureza, como por exemplo o consumo de água, uso de fertilizantes/pesticidas – *“produce more with less”* - como considerar a melhor produção face a riscos de alterações ambientais no futuro (Chryssolouris et al. 2008).

De notar que nem todas as regiões do planeta são afetadas pelas alterações climáticas da mesma forma e, principalmente nas regiões mais pobres, a falta de infraestruturas dificulta o modo de enfrentar os impactos ambientais (Tirado et al. 2010). Nesta perspetiva, por exemplo, a valorização de espécies regionais, mais adaptadas às condições edafo-climáticas, e/ou com maior resistência a alguns fatores bióticos/abióticos será uma mais-valia para a produção sustentável (Ellis 2011). Outra abordagem passa pela valorização de espécies de largo espetro de utilização (alimentação, indústria, madeira, etc), como é o caso de espécies lenhosas como o moringueiro (*Moringa oleifera*), coqueiro (*Cocos nucífera*), sobreiro (*Quercus suber*), castanheiro (*Castanea sativa*), oliveira (*Olea europaea*), entre outras.

Minimizar os danos que, hoje em dia, são maioritariamente causados pelas emissões antropogénicas torna-se uma prioridade. Por isso, é importante aprofundar o conhecimento e entender de que forma as plantas respondem às variações ambientais podendo contribuir para o futuro desenvolvimento de estratégias de mitigação (Olesen e Bindi 2002, Callaghan et al. 2010).

1.1.1. CAMADA DE OZONO E RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

A radiação solar acontece naturalmente no planeta Terra e apresenta grande influência nas alterações climáticas. Arbitariamente, a radiação pode ser classificada em Ultravioleta A (315-400nm), Ultravioleta B (280-315nm) e Ultravioleta C (100-280nm) (ICNIRP, 2004). Uma grande parte da radiação ultravioleta que atinge a superfície terrestre é UVA (95%) e apenas 5% é UVB (Figura 4). Isto acontece porque a maior parte da radiação UVB é filtrada pela camada de ozono e outro tipo de gases atmosféricos. Assim, quando se verifica uma redução da camada de ozono na estratosfera, as probabilidades de aumentar a quantidade de radiação UVB que atinge a superfície terrestre são notórias (Madronich et al. 1998).

Metil clorofórmio, hidrocarbonetos halogenados e clorofluorocarbonetos (CFC'S) são os principais compostos que atacam a camada de ozono. Por serem muito estáveis e apresentarem elevados tempos de vida são transportados pelo vento até à estratosfera, sendo aí transformados em clorina e bromina. Estes químicos destroem diretamente as moléculas de ozono, permitindo a passagem de grandes quantidades de radiação ultravioleta (US-EPA 2010). Visto que nas últimas três décadas o tamanho da camada de ozono registado tem vindo a diminuir, principalmente devido às emissões de clorofluorocarbonetos (CFC'S), um interesse considerável nos efeitos nocivos da radiação UVB nos organismos vivos tem vindo a emergir (Bais et al. 2006, Kakani et al. 2003) (Figura 4).

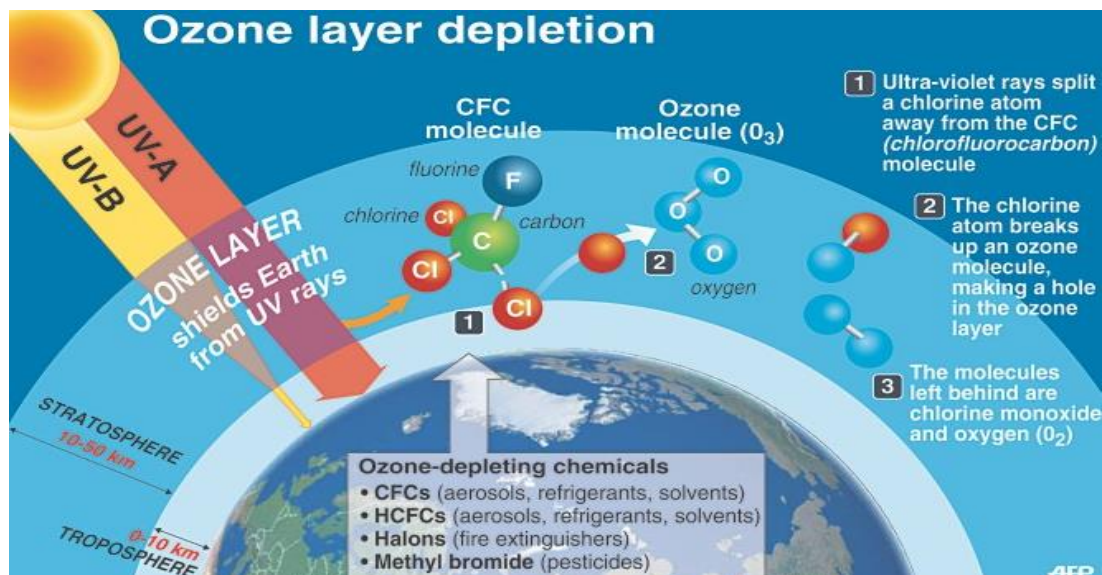


Figura 4 - Fenómeno da destruição da camada de ozono. Retirado de AFP, Paris (2014).

Os ecossistemas terrestres são muito afetados quando existem variações na radiação UV causadas pelas alterações ambientais globais. Apesar da radiação UVB ocupar uma pequena parte

do espectro solar pode influenciar o desenvolvimento e crescimento das plantas (Kakani et al. 2003). A redução da quantidade de ozono estratosférico e o consequente aumento da radiação UVB na superfície terrestre causa efeitos nas plantas, originando danos fisiológicos e morfológicos (Schuch et al. 2009, Ballaré et al. 2011). Aumentos na radiação UVB causam danos diretos nas plantas terrestres reduzindo a produtividade em cerca de 6% (Ballaré et al. 2011).

Segundo Rizzini et al. (2011), as plantas detetam e captam a radiação UVB e, de forma a manter a sua sobrevivência, desenvolveram mecanismos para se protegerem dos danos causados pela radiação UVB. Vários estudos reforçam que as plantas usam a radiação solar UV como uma das principais fontes de informação acerca do ambiente que as rodeia, como por exemplo na defesa contra herbívoros e organismos patogénicos (Kakani et al. 2003, Paul e Gwynn-Jones 2003). No entanto, quando os níveis de radiação sobem, o efeito dos UVB's torna-se nefasto, causando alterações na composição bioquímica da planta (Rozema et al. 1997, Yao et al. 2006, Heijde e Ulm 2012). Ao nível do metaboloma, sabe-se que, uma das formas de adaptação das plantas passa pelo aumento das quantidades de compostos fenólicos, nomeadamente flavonoides, atuando como fotoprotetores (Agati e Tattini, 2010).

A radiação UVB causa alterações na biodiversidade microbiana com consequências drásticas na fertilidade do solo e pragas. Quando as comunidades de microorganismos são afetadas pela radiação UVB podem alterar as taxas de decomposição em plantas mortas. Em plantas vivas podem afetar a suscetibilidade a infeções fúngicas (Pancotto et al. 2003, Ballaré et al. 2011).

Contudo, Hajnos et al. (2001), Johnson et al. (1999) e Gilbert e Cooke (2001), concluíram que através da indução de compostos secundários nas plantas pela radiação UVB, pode-se verificar um aumento de compostos bioquímicos que poderão ser usados na indústria farmacêutica e alimentar. Um exemplo é o caso do aumento da quantidade de toxóides anticancerígenos em *Taxus baccata* (Hajnos et al. 2001).

Recentemente, Hideg et al. (2013) sugeriram que a radiação UVB pode influenciar o fotorrecetor UVR8 (UV Resistance locus 8), tornando-se assim um regulador ambiental no controlo da expressão de genes, atividades metabólicas e celulares. Contudo, ainda pouco se sabe acerca do modo como este gene atua na planta.

Acerca do papel da radiação UVB nos ecossistemas terrestres, pode-se concluir que existe um balanço entre aspetos positivos e negativos. Visto que apresenta um papel fundamental no equilíbrio e manutenção da biosfera, os efeitos da radiação UVB devem ser sempre estudados incluindo o estado do ozono estratosférico assim como as alterações climáticas associadas (Bornman et al. 2015).

1.1.2. SECA E DEGRADAÇÃO DE SOLOS

Atualmente, flutuações no clima são cada vez mais frequentes e o planeta Terra está a ser constantemente afetado por longos e graves períodos de seca. As chuvas são cada vez menos frequentes, a deflorestação começa a ser descontrolada e a gestão do consumo de água é cada vez mais desequilibrada (Van Lanen et al. 2007, Selvaraju e Baas 2007).

A seca é uma característica normal e recorrente da variabilidade climática (Mpelasoka et al. 2008). Ocorre em praticamente todo o planeta apesar das suas características e intensidade variarem de zona para zona, contudo, devido à ausência de precipitação, provoca desequilíbrios hidrológicos graves afetando ecossistemas (Yordanov et al. 2000).

Dados do relatório publicado pelo Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e Ordenamento do Território (MAMAOT) em 2013, mostram o mapa de Portugal face a problemas de seca entre 2005 e 2012 (Figura 5).

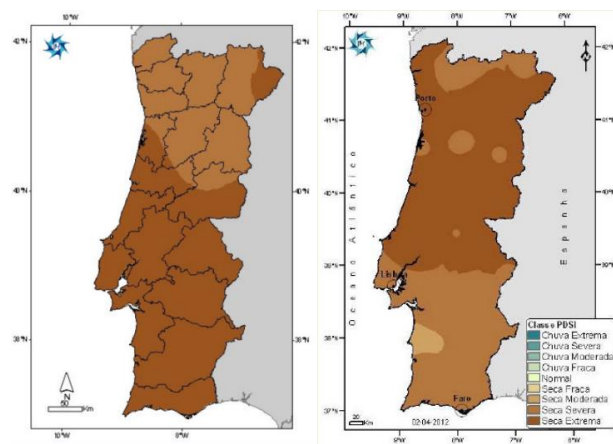


Figura 5 - Percentagem do território em seca meteorológica de acordo com o índice PDSI nos meses em que a seca se fez sentir com mais severidade. À esquerda, em Julho no ano de 2005 - 27% seca severa e 73% seca extrema. À direita em Março de 2012 - 41% seca severa e 57% seca extrema. Retirado do relatório de 2013 do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e Ordenamento do Território (MAMAOT).

Este fenómeno meteorológico tem vindo a acontecer com maior frequência e severidade nos últimos anos em várias partes do mundo, causando grandes impactos a nível económico, social e ambiental (MAMAOT 2013). No entanto, segundo o relatório da WMO (2005), a ausência de uma definição específica e universal para o fenómeno de seca meteorológica dificulta a avaliação de períodos de seca (se uma determinada região está ou não a sofrer de défice hídrico), e o seu grau de severidade. Os impactos da seca, geralmente, encontram-se espalhados por áreas geográficas muito extensas, o que não acontece com outros fenómenos naturais (ex.: inundações, furacões). Isto dificulta a quantificação dos impactos e a prestação de auxílio humanitário, que nestes casos é escasso devido ao facto da seca ser um fenómeno lento e de difícil previsão. Segundo o relatório da WMO os planos de seca devem conter três etapas:

vigilância e aviso precoce, avaliação de riscos e estratégias de mitigação e resposta. Desta forma podem ser evitadas graves situações onde seja notória a falta de água, evitando desastres ao nível da produção, degradação do solo e desertificação.

A água é um recurso indispensável à sobrevivência dos seres vivos e a sua ausência compromete o crescimento e desenvolvimento das plantas. Compreender de que forma a ausência e o uso da água intervêm no crescimento da planta é de grande importância para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (Tilman et al. 2002).

Por serem organismos sésseis, as plantas tiveram de criar mecanismos específicos de adaptação às oscilações dos fatores abióticos (Bartels e Sunkar 2005). Assim, as plantas induzem respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares que lhes permitem apresentar mecanismos quer de escape, quer de resistência à seca (Yordanov et al. 2000).

Contudo, várias estratégias de combate à seca têm sido testadas em laboratório, como o aumento da tolerância à seca através da aplicação de micróbios (Kim et al. 2012) e ainda através de modificações genéticas nas plantas (Golldack et al. 2011, Todaka et al. 2015). Sabe-se que, como forma de resposta ao défice hídrico, as plantas apresentam alterações morfo-fisiológicas, essencialmente nas interações célula-água, o que irá influenciar a sua capacidade de tolerância ao seu meio ambiente (Cordeiro et al. 2009).

Quando as plantas se encontram perante uma situação de seca, é provável que ocorram alterações moleculares e consequentemente fisiológicas. Assim, estudar o modo como a seca afeta o desempenho metabólico das plantas ajuda a perceber as respostas fisiológicas e a desenvolver estratégias de mitigação.

Atualmente muitos estudos tem incidido na reação fisiológica das plantas face a stresses abióticos, como é o caso da seca (Munné-Bosch e Alegre 2000, Ogaya e Peñuelas 2003, Dias et al. 2014b, Vasques et al. 2015). Contudo, menos se sabe acerca dos efeitos da seca ao nível do metabolismo das plantas. Assim, vários autores relatam que, futuramente, os estudos nesta área devem incidir sobretudo na alteração das vias metabólicas com produção de outras moléculas, genes e compostos-chave que estão envolvidos nas respostas das plantas face ao défice hídrico (Bartels e Sunkar 2005, Jones 2007, Ashraf 2010).

1.2. IMPACTO DAS ALTERAÇÕES CLIMÁTICAS EM PLANTAS: O CASO DE ESPÉCIES FLORESTAIS

As alterações climáticas ao longo dos últimos anos têm sido postas em causa como sendo um fator de impacto na extinção de espécies (Thomas et al. 2004). Thuiller et al. (2005) propõem a importância da evolução dos efeitos das mudanças climáticas em espécies vegetais na Europa.

No que toca à conservação de espécies vegetais, uma grande percentagem poderá tornar-se vulnerável. Estes autores concluíram também que a forte relação que existe entre a perda de espécies e as mudanças em variáveis bioclimáticas implica que sejam tomadas medidas no sentido de reduzir as emissões de gases com efeito de estufa podendo desta forma mitigar os efeitos das alterações climáticas na diversidade de plantas (Thuiller et al. 2005). Nos vários cenários desenhados, estes autores estimam que diferentes regiões respondam de forma diferente às alterações climáticas, com a maior vulnerabilidade nas zonas montanhosas e menos nas regiões do sul do Mediterrâneo e da Panónia. Assim, regiões portuguesas como Trás-os-Montes serão particularmente afetadas (Figura 6).

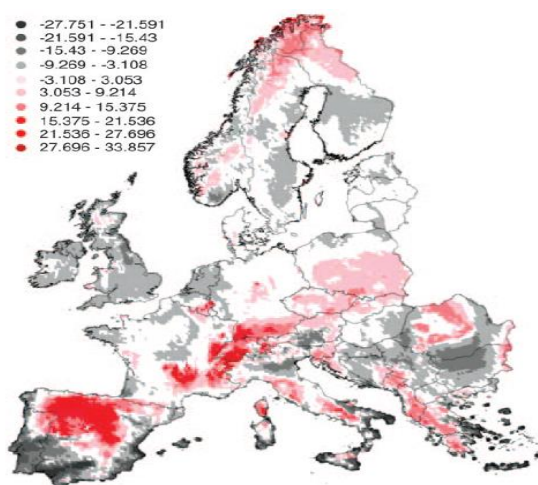


Figura 6 - Projeções mundiais da extinção de espécies que indica se a vulnerabilidade de espécies é alta ou baixa, consoante as características ecológicas e históricas da flora e /ou condições ambientais específicas da região. A cor vermelha indica maior vulnerabilidade de espécies (em vias de extinção) e a cor cinza indica menor vulnerabilidade. Retirado de Thuiller et al. 2005.

Um estudo feito acerca do modo como os padrões climáticos afetam ecossistemas agrícolas Europeus (ao nível das colheitas, rendimentos, proteção das culturas e gado) concluiu que devido a todos estes impactos negativos é necessário criar rapidamente novas estratégias de mitigação e adaptação das culturas (Bindi e Olesen 2011). A seca e a consequente degradação de solos têm importantes efeitos nos ecossistemas pelo que o conhecimento destes danos na produção agroflorestal requer maior conhecimento das respostas fisiológicas, metabólicas, genéticas e ecológicas das espécies vegetais (Bellard et al. 2012).

Os estudos anteriormente citados focam os efeitos negativos que as alterações climáticas provocam nas plantas nomeadamente no desaparecimento de espécies. No entanto, há ainda outra perspetiva, que se foca nas alterações induzidas na fisiologia e em metabolitos de plantas que estejam associados a adaptações destas espécies a fatores de stress. Uma vez que muitos

destes processos de adaptação implicam profundas alterações metabólicas, espera-se também que estas adaptações afetem o perfil de metabolitos dessas espécies (DaMatta et al. 2010).

Novos compostos químicos isolados de plantas têm vindo a ser descobertos, permitindo investir no sector industrial. As indústrias farmacêutica, alimentar e de materiais são as que mais têm crescido usando as plantas como matéria-prima.

Devido a ações antrópicas, as alterações climáticas têm sido muito rápidas em comparação com a capacidade de resposta e adaptação das plantas ao meio em que se encontram. Assim, mutações adaptativas não são suficientes para criar respostas fisiológicas favoráveis, deixando estes organismos dependentes da diversidade genética existente para permitir adaptação. Isto acontece porque em algumas espécies a diversidade genética existente pode não ser suficiente para responder com êxito às rápidas mudanças climáticas (geralmente são espécies que no seu traço evolutivo foram sujeitas a afunilações populacionais (fenómeno geralmente designado por “Bottleneck”)) (Hill et al. 2011).

1.2.1. EFEITOS DO DÉFICE HÍDRICO E DA RADIAÇÃO UVB EM PLANTAS

a) DÉFICE HÍDRICO

Definir e avaliar corretamente a forma como as plantas respondem às alterações climáticas é um pré-requisito que permite definir uma forma de uso sustentável tanto para o Homem como para o planeta Terra. O défice de água nas plantas é geralmente considerado como uma redução no potencial hídrico e turgor que consequentemente irá afetar as funções normais da planta. O fecho dos estomas, a alteração da concentração de pigmentos e a limitação das trocas gasosas são reações da planta face ao stress hídrico que podem levar a perturbações ao nível do metabolismo, estrutura celular e reações enzimáticas da planta (Farooq et al. 2009). No entanto, ao longo do tempo as plantas desenvolveram mecanismos que lhes permitem detetar as entradas e saídas de água e rapidamente regular a sua fisiologia e metabolismo criando respostas de “feedforward”, como é o caso da abertura e fecho dos estomas na regulação das entradas e saídas de água. Vários estudos comprovam que as respostas fisiológicas das plantas em situações de stress hídrico incluem alterações foliares (ex.: murchidão, redução do tamanho e queda da folha) e estimulação do crescimento radicular. Durante a época de floração as plantas encontram-se mais suscetíveis aos stresses abióticos. Nestes casos, para melhorar a eficiência do uso da água, a planta possui uma hormona de stress (Ácido abscísico - ABA) que induz o fecho dos estomas reduzindo assim a perda de água através da transpiração (Ort e Ainsworth 2012). Assim, várias respostas fisiológicas, moleculares e bioquímicas são geradas quando a planta enfrenta condições abióticas anormais, como é o caso do défice em água (Oliveira et al. 2013) (Figura 7).

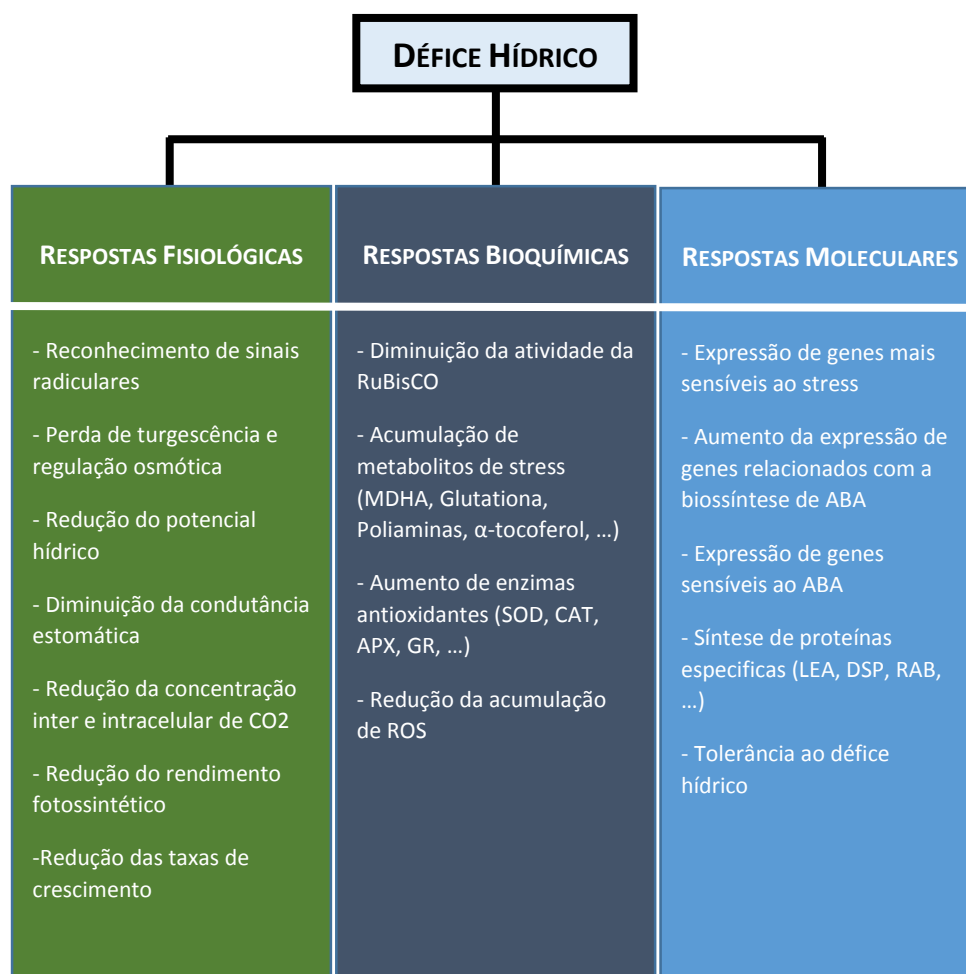


Figura 7 - Respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares das plantas em déficit hídrico (adaptado de Oliveira et al. 2013)

Devido ao aumento e diversidade de alterações climáticas atuais, as plantas podem estar a permitir adaptações genéticas em espécies de ciclo de vida curto impedindo a adaptação de espécies de ciclo de vida mais longo como é o caso das lenhosas. Assim, a capacidade de adaptação das espécies lenhosas está completamente dependente da carga genética que poderá não ser suficientemente eficaz para manter a linhagem (Ort e Ainsworth 2012).

b) RADIAÇÃO UVB

A radiação solar é uma condição essencial à vida vegetal, no entanto, ocorre sempre uma alteração na composição química da planta. Contudo, alterações na camada de ozono estratosférico (ex.: acumulação de CFC's) tem levado a maior risco de exposição de plantas a radiação UV, sobretudo UVB (Hidema e Kumagai 2006).

Segundo Caldwell et al. (1998) a radiação UVB raramente prejudica o rendimento das plantas mas provoca algumas alterações morfológicas (ex.: aumento de ceras epicuticulares e espessura

da folha), químicas e bioquímicas. Por outro lado estudos sobre os efeitos de UVB no desenvolvimento e rendimento de leguminosas e gramíneas, têm apontado para a existência de espécies e cultivares (como é o caso do arroz) altamente sensíveis a radiação UVB afetando o crescimento, desenvolvimento e rendimento. No arroz (*Oryza sativa*), Hidema e Kumagai (2006), verificaram que a radiação UVB causa um aumento nas proteínas de armazenamento como a glutelina, originando grãos de arroz de tamanho inferior ao normal. Os mesmos autores apontam para alterações no perfil de resposta a radiação levar a alterações do sabor do grão.

Períodos de seca e desequilíbrios nas quantidades de radiação solar UV causam alterações no metabolismo primário e secundário, condicionando os usos das plantas (Boeger e Poulson 2006, Ort e Ainsworth 2012, Akula e Ravinshankar 2011)

A investigação que tem sido feita nesta área incide mais nos efeitos da radiação UVB em culturas e menos em espécies florestais, comprometendo o conhecimento do comportamento de espécies florestais do Hemisfério Sul e Equador (ex.: *Moringa oleifera* e *Eucalyptus globulus*) ou por exemplo de zonas mais temperadas como é o caso da região Mediterrânica (ex.: *Quercus suber* e *Olea europaea*) às alterações climáticas destas regiões. Contudo, como salientado por Ryan e Hunt (2005), serão estas regiões as que apresentarão potencialmente maior risco de vulnerabilidade a modificações da camada de ozono estratosférico.

Saliente-se ainda a referência a efeitos da radiação nos danos de DNA que levam à produção de dímeros de pirimidina (CPD's - cyclobutane pyrimidine dimer) e fotoprodutos (6,4). Estes danos interferem na replicação de DNA e transcrição (Hidema et al. 1999). Por outro lado, o efeito dos UV's na modificação de proteínas através da foto oxidação e no aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS – Reactive oxygen species) também foi descrita para algumas espécies como o arroz (Hidema e Kumagai 2006). Em algumas espécies o aumento de radiação UV também leva à inibição da fotossíntese, por exemplo através da redução de conteúdos de clorofilas e da atividade da RuBisCO (Fedina e Velitchkova 2009, Hidema et al. 1992).

Para além dos fatores aqui referidos, as alterações climáticas podem ainda incluir outros fatores que frequentemente atuam de forma combinada como aumentos de temperatura, CO₂, níveis de poluentes (ex.: aumento de ozono e de partículas suspensas) e cheias. Por atuarem em geral de forma combinada, estes aspetos aumentam a dificuldade de selecionar espécies com múltiplas resistências, e potencia a investigação vegetal numa perspetiva funcional, por exemplo combinando a fisiologia com expressão de genes e metabolómica.

1.2.2. PARÂMETROS USADOS NA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DÉFICE HÍDRICO E RADIAÇÃO UVB EM PLANTAS

A análise da resposta das plantas a stresses abióticos tem incidido sobretudo em taxas de crescimento, metabolismo do carbono, stress oxidativo, genotoxicidade e regulação genética, regulação hormonal entre outros. Em particular, as trocas gasosas (taxa de assimilação de CO₂, taxa de transpiração e concentração intercelular de CO₂) e a fluorescência da clorofila *a* (eficiência máxima e efetiva do fotossistema II) dão informação acerca do desempenho fisiológico das plantas em condições de stress (ex.: Dias et al. 2014c, Pandey et al. 2015, Boudjabi et al. 2015). Também a quantificação da concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e carotenoides), açúcares solúveis e amido (quantificados espectrofotometricamente) são parâmetros muito usados para avaliar a resposta das plantas ao stress. Já em relação ao stress oxidativo, a permeabilidade da membrana e a peroxidação lipídica (concentração de MDA) são indicadores importantes de danos oxidativos causados por stress abiótico (ex.: Monteiro et al. 2012, Silva et al. 2010, Dias et al. 2013).

Por outro lado as “ómicas” vieram trazer uma perspetiva mais abrangente das populações de genes, proteínas e de metabolitos que não só existem naquelas espécies, órgãos e tecidos mas como variam em resposta ao stress (Das et al. 2015). Estas análises “ómicas” permitirão uma integração dos conhecimentos obtidos na vertente fisiológica. Em particular, o crescimento das plantas está associado ao metabolismo primário da fotossíntese, onde se partem não só para compostos como os açúcares, como para outros compostos precursores e intermediários em vias secundárias. Conhecer como as duas fases da fotossíntese são afetadas pela radiação e seca é crucial para se perceber o efeito destes stresses na fotossíntese. Alexieva et al. (2001) e Bernal et al. (2013) mostraram que a radiação UVB diminui a concentração de clorofilas e Skórska e Szwarc (2007) verificaram uma diminuição da eficiência fotossintética.

Por outro lado, na fotossíntese, para além da fase luminosa, há ainda a fase não dependente da luz (Ciclo de Calvin), de que resulta a produção de açúcares e em última instância a síntese e acumulação de amido. Estes açúcares podem ser determinados por espectrofotometria (ex. Dias et al. 2013, Rodriguez et al. 2015).

Este conhecimento pode ser complementado pela informação muito mais abrangente da área da metabolómica. A análise do metaboloma pode ser uma ferramenta importante para se perceber as alterações que ocorrem nas vias metabólicas das plantas quando expostas a fatores de stress. Apesar de existirem diversas técnicas cromatográficas de análise química (ex. HPLC, GC, TLC, RMN, entre outras), a sua combinação proporciona um estudo completo do metaboloma. Geralmente, estas técnicas ocorrem em três etapas: extração dos compostos da matriz,

separação e identificação dos analitos e a sua identificação e /ou caracterização (Chiaradia et al. 2008). Apesar de todas estas técnicas se basearem no mesmo princípio (distribuição dos analitos entre duas fases imiscíveis), para escolher a técnica mais adequada é necessário conhecer as propriedades químicas dos analitos em questão. No caso específico da análise de voláteis, o método mais comum e mais adequado é a extração dos compostos através de *headspace* (HS). Esta técnica permite analisar analitos mais voláteis que a matriz, através da análise do vapor que surge quando a amostra sofre aquecimento e agitação. Uma das principais características do HS é que possibilita a introdução da amostra no GC sem qualquer pré-tratamento, podendo analisar material biológico fresco. O HS pode ainda ser realizado de duas formas distintas, estático (os voláteis são recolhidos no HS do frasco após equilíbrio de volatilização) ou dinâmico. No modo dinâmico, um fluxo de gás inerte é inserido na amostra e os analitos voláteis são transferidos para uma armadilha (trap) a alta temperatura (ex.: fibra SPME), sendo posteriormente inseridos no cromatógrafo (Tipler 2013). A fibra de SPME (figura 8) está inserida no interior de uma agulha especial e consiste num “tubo” de fibra de sílica fundida com 100mm de diâmetro, aproximadamente, que está recoberta com um polímero (ex.: polidimetilsiloxano - PDMS, poliacrilato - PA, Carbowax - Cwx). Durante o processo de extração, a agulha que contém a fibra de SPME (Solid-Phase Micro Extraction) fura o septo do *vial*, a fibra estende-se para baixo ficando exposta aos voláteis libertados pela amostra e começa a adsorver os compostos durante um período de tempo. A fibra é novamente recolhida para dentro da seringa, retirada do *vial* e é inserida no injetor do GC, onde é novamente exposta para dessorção térmica (Valente e Augusto 2000). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho (Figuras 9 e 10). A junção da cromatografia gasosa (elevada seletividade e eficiência de separação) com a espectrometria de massa (permite obter informação acerca da estrutura e massa molar assim como aumentar a seletividade) tem apresentado grandes vantagens na área da investigação visto que permite obter resultados mais rapidamente e de forma mais eficaz (Vas e Vékey 2004). Para detecção dos compostos no MS podem ser usados vários tipos de detetores (IT, ToF, Quadrupólo, Razão isotrópica, entre outros). No caso do ion trap, a detecção é maximizada pela otimização da quantidade de iões que ficam na armadilha (trap) e dos parâmetros envolvidos na dissociação dos iões percursores com um gás inerte (ex. hélio - He) para obter iões com grande abundância relativa no espectro. Os iões que ficam retidos no trap são dissociados e os iões que posteriormente são produzidos na dissociação tornam-se sequencialmente instáveis, sendo libertados do trap gerando assim um espectro de massa. Quando o detetor de massa usado no MS é do tipo quadrupólo, os iões são introduzidos com uma velocidade constante através da aplicação simultânea de uma corrente contínua e de radiofrequência e seguem em direcção aos polos (direcção z), oscilando entre as posições x e y.

A oscilação varia consoante a razão m/z de cada ião (Azevedo 2004). Vários trabalhos na área vegetal têm sido realizados com cromatografia gasosa (Rocha et al. 2001, Moreira et al. 2013, Chen et al. 2013, Kwon et al. 2013, Isca et al. 2014), apesar das variações específicas que se alteram de instrumento para instrumento.



Figura 8 - Fibra SPME PDMS/DVB 65 μ m. Retirada de Sigma-Aldrich.



Figura 9 – GC/MS Varian CP-3800. Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto



Figura 10 – GC/MS GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu. Retirado de Shimadzu.

As técnicas de extração podem também variar consoante o aparelho, pelo que alguns aparelhos conseguem fazer a extração autónoma dos analitos da amostra, enquanto que outros não o conseguem fazer. Além disso, nem todos os aparelhos têm a capacidade de volatilizar os compostos, sendo necessário fazer uma derivatização (silação ou hidrólise) antes da injeção no cromatógrafo. Os compostos identificados por cada tipo de GC variam consoante a coluna cromatográfica que possuem pois cada coluna apresenta uma especificação e características únicas (Figuras 9 e 10).

1.3. ESPÉCIES SELECIONADAS

Neste contexto, dadas as alterações climáticas emergentes, torna-se essencial perceber se ocorrem transformações ao nível do metaboloma das plantas e a forma como elas reagem fisiologicamente aos impactos ambientais, como cenários onde existe falta de água e alterações dos níveis normais de radiação UVB. Duas espécies encontradas em zonas de risco ambiental e relevantes na literatura pelos seus compostos químicos foram selecionadas para estudar o seu desempenho face a condições de défice hídrico e elevados níveis de radiação UVB: a *Moringa oleifera*, uma espécie nativa da região dos Himalaias e o *Eucalyptus globulus* Labill., originário da Austrália.

1.3.1. EUCALYPTUS GLOBULUS

A) CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

O *E. globulus* conhecido vulgarmente como Eucalipto comum, é uma espécie florestal pertencente à família Myrtaceae e abrangida pela ordem Myrtales. Esta espécie, nativa da Austrália e Tasmânia mas introduzida na Península Ibérica nos finais do século XIX, ocupa cerca de 20% da área florestal de Portugal Continental. O *E. globulus* é uma planta lenhosa perene (apresenta estrutura lenhosa e um ciclo de vida longo) que cresce verticalmente atingindo cerca de 45 a 55 metros de altura (Figura 11a). O caule apresenta um ritidoma (cobertura exterior do tronco) liso, em tons de cinza-claro que se vai desprendendo ao longo do tempo na parte superior, ficando pendente na árvore. A madeira é esbranquiçada e apresenta fibras muito fortes mas flexíveis (Figura 11a). As folhas jovens do *E. globulus* são sesseis (o limbo está diretamente ligado ao caule), fisicamente assemelham-se a uma lança (lanceoladas) e têm um aspeto ceroso de cor azulada (Figura 11b). As folhas desenvolvidas têm um aspeto um pouco diferente, são mais alongadas e a cor é um pouco mais esverdeada (Figura 11c). As flores são esbranquiçadas, florescendo nos meses de Setembro e Outubro (Figura 11d). O fruto do *E. globulus* assemelha-se a uma cápsula lenhosa com odor característico e contém inúmeras sementes no seu interior, libertadas aquando a maturação (Figura 11e).

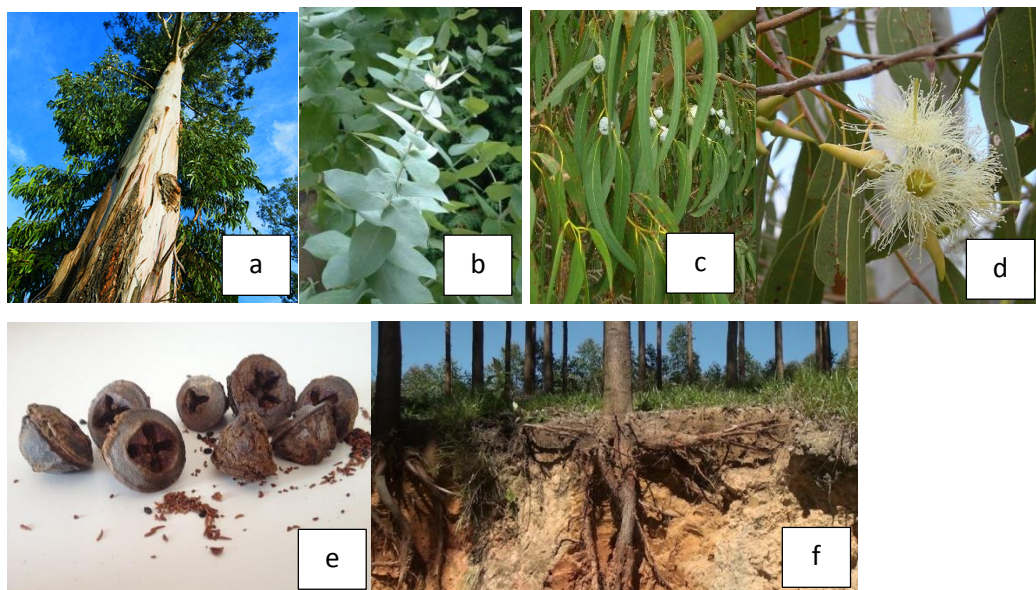


Figura 11 – Composição de *E. globulus*: árvore (a), folhas jovens (b), folhas desenvolvidas (c), flor (d), fruto (e) e raiz (f). Retirado de <https://havenessence.com/shop/aromatherapy-oils-carriers/eucalyptus-globulus-10ml/>; http://www.alibaba.com/product-detail/Eucalyptus-Globulus-Oil-Eucalyptus-leaf-Oil_624713486.html; <http://www.painelflorestal.com.br/noticias/silvicultura/o-ciclo-nutricional-de-uma-arvore-de-eucalipto-clonado>; https://pt.wikipedia.org/wiki/Eucalyptus_globulus#/media/File:Starr_051123-5467_Eucalyptus_globulus.jpg; <https://basalore.wordpress.com/2014/12/16/eucalyptus-globulus/>; http://www.phytoterapica.com.br/loja/index.php?route=product/product&product_id=87.

O *E. globulus* prefere solos ligeiramente ácidos e locais frescos e húmidos. Têm uma enorme capacidade de absorção de água do solo devido ao seu extenso sistema radicular (Figura 11f) (Paiva 1997).

B) IMPORTÂNCIA ECONÓMICA E SOCIAL

As alterações que têm sido exercidas nos padrões climáticos regionais têm forte incidência na agricultura, nomeadamente em espécies florestais como é o caso do *E. globulus* e *M. Oleífera*. Como as florestas se encontram sob forte pressão climática são esperados grandes impactos na sociedade, especialmente a nível económico. Perdas de rendimento para os proprietários florestais e reduções de matéria-prima para a indústria são dois fatores que, caso não sejam tomadas estratégias de mitigação, irão afetar drasticamente a economia mundial (Hanewinkel et al. 2013).

Tendo em conta que o *E. globulus* apresenta um rápido crescimento e uma grande capacidade de regenerar e rebentar quando podado, esta espécie tem vindo a apresentar grande importância económica e social por todo o mundo (Ball 1995). Várias indústrias tem usado o *E. globulus* como matéria-prima para a produção de pasta de celulose usada no fabrico de papel, carvão vegetal, lenha, madeira. Devido ao forte aroma e propriedades medicinais, as indústrias

farmacêuticas e alimentares têm vindo a descobrir vários usos do *E. globulus* como por exemplo na produção de óleo essencial (perfumaria e aromaterapia) e fabrico de mel (Martos et al. 2000, Rockwood et al. 2008). Recentemente, o *E. globulus* tem sido também usado como matéria-prima na produção de metanol, óleos industriais e/ou como substituto do petróleo (Ghosh et al. 2007, Pidtasang et al. 2013).

Reconhecer a necessidade de criar práticas florestais sustentáveis está cada vez mais a envolver a sociedade em programas agroflorestais. Assim, a escolha adequada das espécies para um determinado local de plantação e o desenvolvimento de novas práticas na manutenção de solos como o uso de equipamentos mais fáceis de manusear e a prestação frequente de serviços sociais têm sido discutidas e avaliadas no sentido de promover economias locais e/ou nacionais. O retorno financeiro é o principal fator que leva à plantação do *E. globulus* na maior parte do mundo, no entanto, já existem programas sustentáveis que têm como objetivo a proteção e conservação da espécie (Ball 1995, Lal 2010).

1.3.2. MORINGA OLEIFERA

A) CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

A *M. oleifera*, vulgarmente conhecida como moringa ou moringueiro, é indígena das colinas dos Himalaias, no Sul da Ásia. Hoje em dia, encontra-se já distribuída pelas Filipinas, USA, Caraíbas, Cambodia, Índia, Paquistão, África e Arábia (Fahey 2005). A *M. oleifera* é uma planta angiospérmica (produz raiz, caule, folha, flor, semente e fruto), pertencente à família das *Moringaceae*, uma família que se encontra abrangida pela ordem *Brassicales* (Ramachandran et al. 1980). A *M. oleifera* é uma árvore de folha caduca que pode atingir entre 10 a 15m de altura e apresenta um crescimento bastante rápido (Moura et al. 2009) (Figura 12a). O ramo foliar é paripinado (o número de folíolos no ápice é par) podendo atingir 45cm de comprimento. As suas folhas são verdes e apresentam uma fina camada de pêlo na face superior, quase invisível a olho nu. As nervuras das folhas apresentam uma cor avermelhada e são crenadas (possuem pequenas elevações arredondadas). Os ramos, quando jovens, são verdes e finamente peludos, tornando-se acastanhados ao longo do tempo (Figura 12c). As suas flores perfumadas apresentam uma cor branca amarelada e encontram-se em forma de panícula (apresentam um rácemo composto onde os ramos vão decrescendo da base para o ápice) (Figura 12d). Os frutos da *M. oleifera* têm a forma de vagem e podem atingir 30 a 120cm, apresentam cor verde na sua forma imatura e uma cor acastanhada na maturação (Figura 12e). A formação das vagens ocorre geralmente entre Março e Abril. Cada vagem apresenta aproximadamente 26 sementes, com 1cm de diâmetro, e uma cor acastanhada, compostas por três folhetos amarelados (Figura 12f). Cada árvore

consegue produzir, anualmente, de 15 000 a 25 000 sementes. As raízes são tuberosas e de cor branca, apresentando um odor apimentado característico (Figura 12b). O tronco é espesso e apresenta uma cor branca-acinzentada, e a sua madeira é caracteristicamente suave e leve. O tronco desta árvore, quando ferido, liberta uma goma de cor branca (Roloff et al. 2009, Wadhwa et al. 2013).

Esta espécie cresce bem em climas quentes e húmidos, não demonstrando grandes exigências climáticas (Moura et al. 2009). Desenvolve-se bem em solo arenoso, com pH entre 5.0-9.0. e é facilmente adaptável a diferentes ecossistemas e ambientes agrícolas, tendo demonstrado ser pouco perturbada pela seca e doenças (Anwar et al. 2007). Apresenta um rápido crescimento, podendo atingir até 7 metros por ano (Wadhwa et al. 2013). Esta planta é muito tolerante tanto ao calor como ao frio, resistindo a temperaturas entre -1°C e 48°C. Admite precipitações anuais de 750 a 2200mm, demonstrando-se tolerante a irrigações e períodos de seca elevados (Anwar et al. 2007, Godino et al. 2013).

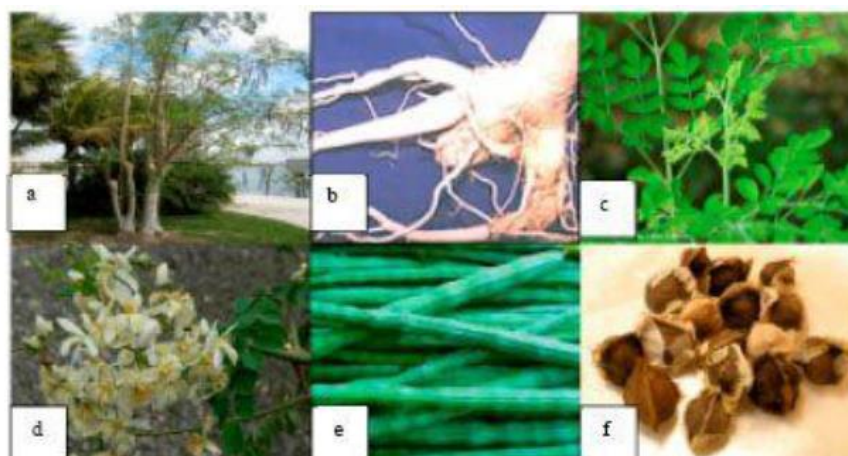


Figura 12 – Composição da *M. oleifera*: árvore (a), raiz (b), porção aérea (c), flor (d), vagem/fruto (e) e semente (f). Retirado de Omotesho et al. 2013.

B) USOS E PROPRIEDADES MEDICINAIS

Desde tempos remotos que a *M. oleifera* era utilizada por romanos, gregos e egípcios. Ficou conhecida por vários nomes, como Drumstick tree, Miracle tree, Ben tree, entre outros (Ramachandran et al. 1980). Uma das qualidades mais profícuas da moringa é o seu elevado valor nutricional, que é tão abençoado pelas mães lactantes e pelas crianças, nos trópicos, uma vez que combate de forma eficaz a desnutrição. Apresenta elevadas quantidades de aminoácidos, vitaminas e minerais que são essenciais aos primeiros tempos de vida do ser humano (Moyo et al. 2013).

Esta árvore, nos últimos tempos, tem sido defendida como uma excelente fonte indígena de propriedades terapêuticas e farmacológicas. Através de resultados científicos, já é possível comprovar alguns dos seus efeitos na medicina convencional, como por exemplo, a atividade hepatoprotetora, atividade antioxidante, atividade cardiovascular, atividade antiepilética, atividade antiasmática, atividade antifertilidade, atividade antidiabética, atividade antiurolitíase, diurética, atividade anticancerígena, atividade anti-inflamatória, antibiótica, atividade anti-ulcerígena, atividade anti-hermíntica, atividade antipirética e atua como anestésico local ao nível do SNC (Goyal et al. 2007). Na medicina tradicional as folhas da *M. oleifera* são usadas no combate a infecções, em casos de febre alta, no combate da anemia e hipertensão, em situações de disenteria, diarreia, gastrite e reumatismo. As raízes combatem as cáries dentárias, são cardiotônicas, combatem a febre, constipações, asma, diarreia e flatulência e são ainda usadas como afrodisíaco. O caule pode ser usado no combate a picadas de cobras e escorpiões, em constipações, colites, histeria e ainda no combate à epilepsia. As flores podem ser usadas no combate a constipações, a reumatismo e apresentam também efeito diurético. As suas vagens ajudam no combate à hipertensão, diabetes e cancro da pele. As sementes são usadas no combate a tumores, reumatismo, artrite e espasmos. O exsudado libertado pelo caule (goma branca) ajuda no combate da asma, reumatismo, disenteria, febre e cáries dentárias (Anwar et al. 2007, Kasolo et al. 2010, Mahmood et al. 2010).

Apesar do seu sabor e cheiro característico, a *M. oleifera* começou a fazer parte da alimentação humana. Na culinária, é incluída em várias receitas originais dos trópicos e as suas folhas são usadas para conferir um sabor picante e agri-doce aos pratos (Fahey 2005).

Apesar das suas inúmeras propriedades medicinais esta árvore tem sido usada para a produção de biomassa, na forragem animal, produção de biogás, produção de corante, fertilizante, o sumo das folhas é usado como nutriente foliar, fabrico de mel, biopesticida, produção de celulose, purificação da água, produção de óleo essencial, entre outras. Na Índia, a Moringa apresenta elevado potencial na indústria do papel, pois a celulose característica da madeira é ótima para produção de têxteis, celofane, papel de escritório e embalagens. Na Jamaica, é usada em larga escala para a produção de corante “blue dye” (Foidl et al. 2001, Rashid et al. 2008, Silva et al. 2010, Aho e Lagasi 2012, Oliveira-Júnior et al. 2013).

É importante ter em conta que o ambiente afeta o desenvolvimento dos organismos vivos e pode-se transformar drasticamente a qualquer instante. A agricultura é um elo de ligação entre os ecossistemas e a sociedade e, como tal, encontra-se muito afetada pelas alterações climáticas globais. Assim, estudar o modo como as alterações climáticas podem afetar o desempenho e sobrevivência de espécies vegetais é essencial para entender a sua capacidade de adaptação. De entre as várias alterações climáticas emergentes, foram selecionadas para este estudo o défice hídrico e a exposição a radiação UVB. Os objetivos gerais desta dissertação foram perceber quais os efeitos do défice hídrico (seca) e radiação UVB, no perfil de metabolitos e no desempenho fisiológico de plantas jovens de *E. globulus* e *M. oleifera*. Em particular:

- Na espécie *E. globulus* foi estudado o efeito da radiação UVB na fotossíntese, no conteúdo em pigmentos fotossintéticos e na concentração de açúcares solúveis totais e amido. A determinação destes metabolitos foi realizada espectrofotometricamente. Adicionalmente, e para ter uma análise completa, o perfil de metabolitos foi analisado através de cromatografia gasosa (GC-MS).

- Na espécie *M. oleifera* foi estudado apenas o efeito do défice hídrico no perfil de metabolitos (análise por GC-MS).

Na análise de cromatografia gasosa em *E. globulus* e *M. Oleifera* foi usado um GC-MS com especificações diferentes, o que permitiu obter resultados semelhantes, aplicando diferentes técnicas de extração. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa permitiu obter vários cromatogramas e assim desenhar um perfil e comparar, através das diferentes amostras, quais eram os compostos químicos mais afetados quando expostos a fatores de stress (défice hídrico e radiação UVB).

Capítulo 3

Resposta do *Eucalyptus globulus* à radiação UVB

3. RESPOSTA DO *EUCALYPTUS GLOBULUS* À RADIAÇÃO UVB

3.1. RESUMO

O *Eucalyptus globulus* é uma espécie florestal com grande valor económico, medicinal e industrial. Esta espécie originária da Tasmânia está atualmente largamente disseminada em todo o mundo, e dadas as suas múltiplas aplicações, e também impactes ambientais, tem sido amplamente estudada em várias vertentes (ex. fitopatologia, bioquímica, ecologia e ecofisiologia). Embora considerada uma espécie com tolerância a alguns stresses ambientais, o eucalipto (tal como outras espécies florestais) enfrenta riscos associados a alterações climáticas cujos danos estão ainda por contabilizar. Assim, foi objetivo deste trabalho perceber os efeitos da radiação UVB no desempenho fisiológico e no perfil de metabolitos desta espécie. Neste trabalho, plantas jovens (3 meses) de *E. globulus* foram expostas a uma intensidade de radiação (radiação efetiva total de 12 kJ/m²) próxima de valores máximos já encontrados em condições reais. Para estudar os efeitos do stress UVB foram avaliados parâmetros fisiológicos (trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, concentração de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides, açúcares solúveis totais (AST) e amido, e ainda o perfil de metabolitos, 1 dia e 11 dias após a exposição ao stress. A dose de UVB usada não afetou as reações fotoquímicas nem as trocas gasosas, contudo ao nível do metabolismo do carbono (AST e amido) e do conteúdo de pigmentos verificaram-se pequenas alterações. Algumas destas alterações permaneceram até 11 dias após o final da exposição (TSS e pigmentos). A análise dos compostos voláteis por GC-MS mostrou abundância sobretudo nas famílias dos terpenos, sesquiterpenos e aldeídos. Um dia após o stress houve um aumento sobretudo de aldeídos e um decréscimo de terpenos e sesquiterpenos. Onze dias após remoção do stress os valores que mais variaram foram os terpenos e sesquiterpenos com decréscimo e com tendência a manter, respetivamente, face ao controlo. A ausência de mortalidade, e os efeitos pouco significativos observados na fotossíntese sugerem uma elevada tolerância desta espécie a este tipo de stress. Esta tolerância pode ser justificada pelas alterações ao nível do metabolismo primário (envolvendo açúcares) e secundário (ex. terpenos) observadas em resposta aos UV's. A correlação destas alterações com potenciais adaptações funcionais são discutidas neste trabalho.

3.2. INTRODUÇÃO

As alterações climáticas emergentes têm um grande impacto no crescimento e desenvolvimento de espécies florestais, nomeadamente em espécies de valor industrial, como é o caso do eucalipto. Assim, é urgente conhecer as respostas fisiológicas e entender as variações

que ocorrem nos perfis metabólicos das espécies mais afetadas. Pouco se sabe sobre as respostas de *Eucalyptus globulus* face a oscilações dos níveis de radiação UVB: em estudos de campo de eucalipto e acácia, Liu et al. (2005) verificaram que o aumento de radiação solar UVB afetava o conteúdo em clorofilas, açúcares solúveis totais, e alguns parâmetros morfológicos como por exemplo a espessura da folha e o conteúdo em ceras. Cameron (1970) verificou em eucalipto que, quando há um aumento da intensidade da luz, as características óticas das folhas jovens não são afetadas significativamente, contudo, quando há um aumento de temperatura verifica-se uma ligeira alteração no poder de refletância das folhas.

O estudo do metaboloma para ajudar a entender o modo como o *E. globulus* reage face às adversidades do meio, ajuda a traçar um perfil químico desta espécie sob várias condições e, por conseguinte, contribui para converter as plantas em matéria-prima para a indústria (ex. alimentar e farmacêutica). Além disso, trabalhos de metabolômica em *E. globulus* permitem ainda traçar um perfil bioquímico que facilita estudos em outras áreas de investigação como a genética, botânica, agronomia, ecologia e fisiologia.

Existem vários estudos na área da fisiologia vegetal onde é avaliado o desempenho das plantas face a fatores abióticos (ex. salinidade, radiação UVB, défice hídrico). Em 2003, Kakani et al. testaram, em condições controladas, a reação morfológica e anatômica do algodão face a 3 níveis de radiação UVB (0,8 e 16 kJ m² d⁻¹) durante 8h. Após a exposição verificaram uma descida nos parâmetros vegetativos e reprodutivos desta espécie, um aumento no conteúdo de ceras epicuticulares da folha e no índice estomático acompanhado de uma diminuição da espessura da folha. Sarghein et al. (2011) avaliaram a morfologia da pimenta quando exposta a radiação UVA e UVC (18,9 kJ m² d⁻¹ durante 15 dias e 17,2 kJ m² d⁻¹ durante 8 dias, respetivamente). De um modo geral concluíram que esta espécie é sensível à radiação UV mostrando alterações fisiológicas (diminuição da espessura do caule e folhas, redução de novos rebentos, aumento da quantidade e tamanho dos estomas e diminuição do amido) durante a exposição, especialmente quando expostas a radiação UVC. No caso de espécies florestais, como o caso do salgueiro (*S. myrsinifolia*), Turtola et al. (2006) averiguaram as respostas do crescimento de híbridos e espécies não hibridadas de salgueiro expostas a radiação UVB e a défice hídrico. Durante 4 semanas de ensaio, verificaram que havia uma redução significativa no crescimento dos salgueiros e concluíram que a aplicação de doses elevadas de radiação UVB (7,2 kJ m² d⁻¹) e períodos de seca (diminuição de 50% da irrigação normal) tinham efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento desta espécie. Almeida-Costa et al. (2011) acompanharam o processo de fotodegradação da cor natural da madeira de duas espécies tropicais: o jatobá (*H. courbaril*) e o tauari (*C. oblongifolia*), quando expostas a radiação artificial UVB em 4 ciclos de radiação, num total de 168 horas. Estes autores concluíram que a radiação UVB influencia a cor da madeira

causada por fotodegradação, havendo um escurecimento das mesmas. Não se conhecem estudos do perfil metabólico de *E. globulus* quando expostos a radiação UVB. Foi realizado um trabalho por Coriani (2009) onde plantas de *E. globulus* foram expostas a radiação UV (7 w/m² durante 7h/dia num total de 15 dias) e a autora concluiu que a radiação induziu stress oxidativo. Contudo, vários estudos têm sido feitos na área na fisiologia de plantas de *E. globulus* face a stresses abióticos, nomeadamente défice hídrico, stress salino e stress térmico. Correia et al. (2014) estudaram os perfis fisiológicos e bioquímicos do *E. globulus* face a períodos de défice hídrico (um período de seca de 3 semanas e na última semana, um grupo de plantas foi regado normalmente). Os autores observaram uma diminuição na altura, biomassa, potencial hídrico e nas trocas gasosas, enquanto que os níveis de pigmentos, fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm e ΦPSII), MDA e ABA sofreram um decréscimo. No período de recuperação alguns destes parâmetros mantiveram-se enquanto que outros tinham tendência para voltar aos níveis normais semelhantes ao das plantas em condições de controlo. Por outro lado, Bhargava et al. (2014) testaram a capacidade de plantas de *E. globulus* crescerem em ambientes salinos e verificaram que, dependendo da estação do ano (Verão ou Inverno) *E. globulus* tem maior ou menor capacidade de resistência à salinidade. Ainda Costa e Silva et al. (2009) selecionaram espécies de *Eucalyptus* mais resistentes a seca (entre elas *E. globulus*), e avaliaram a capacidade destas espécies resistirem a ambientes de baixas temperaturas (simulando uma geada repentina). Estes autores concluíram que, quando as plantas de *E. globulus* eram submetidas a baixas temperaturas (24°C a -2°C) observava-se uma diminuição das taxas fotossintéticas, condutância estomática, açúcares solúveis totais e enzimas antioxidantes.

Apesar de não se conhecerem estudos acerca do perfil metabólico de *E. globulus* em resposta à radiação UVB, vários autores têm simulado este cenário noutras espécies vegetais. Existem estudos *in vitro* em *V. vinifera* (Gil et al. 2012) onde é delineado o perfil de terpenos, através de análise por GC-EI/MS. As plantas foram expostas a uma quantidade de radiação de 4,75 kJ m² d⁻¹, administrados em duas doses diferentes (uma mais elevada do que a outra). Os autores verificaram um aumento nos níveis de terpenos (sitoesterol, estigmaestrol e lupeol) na dose mais baixa, enquanto que na dose mais elevada houve uma acumulação máxima de terpenos com capacidade antioxidante (mono, di e sesquiterpenos). Ainda em *V. vinifera*, Gil et al. (2013) avaliaram o conteúdo em compostos orgânicos voláteis (VOC's), através de HS-SPME-GC-EI/MS, quando expostos a radiação UVB em 3 estados de desenvolvimento da uva (crescimento, pré-colheita e colheita). Os autores identificaram 10 VOC's em todos os estados de desenvolvimento entre monoterpenos, aldeídos, álcoois e cetonas. Neste estudo, os autores concluíram que a radiação UVB induz a produção de VOC's (essencialmente monoterpenos) na uva para proteger os tecidos da radiação, o que pode vir a afetar o sabor do vinho. Eichholz et al. (2011) estudaram

o impacto da radiação UVB em mirtilos 2 horas após colheita e verificaram um aumento de aldeídos, cetonas e terpenos. Após 24 horas de adaptação verificaram uma redução significativa nos mesmos compostos. Outros autores examinaram os efeitos da combinação da radiação UVB com déficit hídrico em 4 espécies mediterrânicas (*D. gnidium*, *P. lentiscus*, *I. aquifolium* e *L. nobilis*) e, em geral, verificaram que não houve alterações significativas na fotossíntese, condutância estomática e emissão de terpenos, no entanto verificaram-se pequenas variações nos níveis de terpenos entre as espécies (Llusia et al. 2012).

A metabolómica apresenta um complemento importante aos dados de fisiologia no conhecimento das respostas das plantas a stresses abióticos e bióticos. Várias técnicas cromatográficas têm sido usadas neste sentido sendo que as mais eficazes são a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), eletroforese capilar (CE-MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) (Obata e Fernie 2012).

Ao permitir conhecer em detalhe as alterações que ocorrem nas vias metabólicas das plantas quando expostas a stresses bióticos e/ou abióticos, a metabolómica permite uma abordagem abrangente e quantitativa de todas as moléculas pertencentes a um sistema biológico, o que poderá auxiliar estudos importantes noutras áreas “-ómicas” como a genómica ou proteómica.

Neste trabalho, plantas jovens de *E. globulus* foram expostas a radiação solar UVB e foram avaliados os efeitos ao nível da fisiologia e do perfil de metabolitos. A fotossíntese foi determinada através da medição das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*. Adicionalmente, os parâmetros fisiológicos, concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) e hidratos de carbono (açúcares solúveis totais e amido) foram determinados por espectrofotometria. A análise dos metabolitos (voláteis e semi-voláteis) foi feita através de cromatografia gasosa (GC-MS).

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. CONDIÇÕES DE CULTURA E EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB

A) CONDIÇÕES DE CULTURA

Plantas de *E. globulus* com, aproximadamente, três meses de idade foram compradas nos Viveiros Anadiplanta (Anadia, Portugal). As plantas foram transferidas para vasos de plástico (300 ml) com uma mistura de turfa e perlite (3:1) e mantidas durante duas semanas numa estufa com uma intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, humidade relativa de 40% e uma temperatura de 20-21°C. As plantas foram regadas diariamente com, aproximadamente, 30 mL de solução nutritiva Geolia®.

B) EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO UVB

Antes de iniciar a exposição à radiação as plantas foram regadas até à capacidade de campo. As plantas de *E. globulus* quando foram expostas à radiação apresentavam uma altura média de 21.54 ± 1.40 (média \pm desvio-padrão). As plantas de controlo foram mantidas nas condições de crescimento e à capacidade de campo durante todo o ensaio. Para controlar a quantidade de radiação recebida pelas plantas foi usado um radiómetro VLX312 equipado com um sensor UVB (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Cedex, France). Como fonte de emissão UVB foi usada a lâmpada Ten UVB (Sankyo Denki G8T5E, Kanagawa, Japan) com um pico de emissão a 306nm.

As plantas de *E. globulus* com cerca 14 semanas foram divididas em dois grupos, controlo (C) (n=12) e radiação ultravioleta B (n=20). O grupo das plantas expostas a radiação UVB foi dividido em dois subgrupos (n=10 cada). Os dois subgrupos de plantas foram expostos a radiação UVB (radiação efetiva total de 12 kJ/m^2) durante dois dias. As respostas fisiológicas e o perfil metabólico das plantas foram analisados um dia (S1) e onze dias (S11) após o final da exposição a UVB.

Para plantas S1 e plantas S11 mediram-se, *in situ*, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e estudou-se o perfil de voláteis nas folhas de *E. globulus*. Adicionalmente recolheram-se as folhas, congelaram-se em azoto líquido e mantiveram-se a -80°C para posterior análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos e hidratos de carbono.

3.3.2. TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Para determinar os efeitos da exposição à radiação na fotossíntese, determinaram-se:

- a) As trocas gasosas
- b) A fluorescência da clorofila *a*.

A) DETERMINAÇÃO DAS TROCAS GASOSAS

A determinação das trocas gasosas: taxa de assimilação de CO_2 (*A*), taxa de transpiração (*E*), condutância estomática (*gs*) e o rácio entre a concentração intercelular de CO_2 e ambiente de CO_2 (C_i/C_a) foi realizada *in situ* em folhas de *E. globulus*. Para determinar estes parâmetros usou-se um analisador de gases de infravermelhos (Infra Red Gas Analyser: IRGA, LCpro+, ADC, Hoddesdon, UK). O procedimento foi realizado nas mesmas condições de crescimento.

B) DETERMINAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

A emissão da fluorescência da clorofila *a* foi determinada com um fluorímetro portátil (FMS 2, Hansatech Instruments, Norfolk, England). As folhas foram adaptadas ao escuro durante 30 minutos. Após este período obteve-se a fluorescência mínima (F_0) e imediatamente a seguir a um *flash* de luz intenso ($> 1500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) foi registada a fluorescência máxima (F_m). A fluorescência máxima (F_m') foi medida após adaptação das folhas à luz durante 30 minutos (após medição do F_0') e imediatamente a seguir a um *flash* de luz ($> 5000 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$). Segundo Maxwell e Johnson (2000) foram calculados os seguintes parâmetros:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F'_m - F_0')/F'_m$$

O F_v/F_m indica a eficiência máxima do PSII e o Φ_{PSII} indica a quantidade de luz absorvida pela clorofila *a*, associada ao PSII, que é utilizada na fotoquímica (eficiência efetiva do PSII).

3.3.3. QUANTIFICAÇÃO DA CLOROFILA *a*, CLOROFILA *b* E CAROTENOIDES

Os pigmentos fotossintéticos foram quantificados de acordo com Sims e Gamon (2002). As folhas congeladas de *E. globulus* foram maceradas com 1,5 ml do tampão acetona: Tris 50Mm (80:20) pH 7.8. A mistura foi homogeneizada no vórtex durante 30 segundos e centrifugada durante 10 minutos a 10 000g e a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um tubo coberto com folha de alumínio, para impedir a passagem de luz. Adicionou-se novamente ao resíduo 1,5 ml do tampão, homogeneizou-se durante 30 segundos e centrifugou-se nas condições referidas anteriormente. O sobrenadante foi adicionado ao tubo respetivo, no escuro. De seguida foi efetuada a leitura da absorvância do sobrenadante a 663nm (A663), 537nm (A537), 647nm (A647) e 470nm (A470) num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific (Genesys 10-uvS). As amostras foram lidas a partir do branco que continha tampão de extração. Foram quantificados os conteúdos em clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides com base nas seguintes equações:

$$\text{Clorofila } a = 0,01373 A_{663} - 0,000897 A_{537} - 0,003046 A_{647};$$

$$\text{Clorofila } b = 0,02405 A_{647} - 0,004305 A_{537} - 0,005507 A_{663};$$

$$\text{Carotenoides} = (A_{437} - (17,1 \times (\text{Chl } a + \text{Chl } b) - 9,479 \times \text{Antocianinas})) / 119,26;$$

$$\text{Antocianinas} = 0,08173 A_{537} - 0,00697 A_{647} - 0,002228 A_{663}.$$

A concentração final de pigmentos foi apresentada em $\mu\text{mol}/\text{g PF}$.

3.3.4. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS (AST)

A concentração de açúcares solúveis totais (AST) determinou-se de acordo com o protocolo de Irigoyen et al. (1992) com algumas alterações. Num almofariz, homogeneizaram-se as amostras congeladas das folhas (aproximadamente 30-50 mg) com 10ml de etanol a 80%. Colocou-se o homogeneizado num banho a 80°C durante 1 hora, e de seguida colocou-se em gelo durante 10 min. Retiraram-se as amostras do vórtex e centrifugaram-se durante 10 minutos a 10 000g e a 4°C. Retiraram-se 30 µl do sobrenadante e adicionaram-se 0,75 ml de uma solução de antrona (40 mg de antrona dissolvida em 20 ml de ácido sulfúrico e 1 ml de água destilada). A solução resultante colocou-se num banho a 100°C durante 10 min, e de seguida, para parar a reação, colocou-se em gelo durante 15 minutos. Leu-se a absorvância do sobrenadante a um comprimento de onda de 625nm num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific spectrophotometer, Genesys 10-uvS. Para o branco utilizou-se uma solução de 0,75 ml de antrona com 30µl de etanol. Determinou-se a concentração de AST a partir da curva padrão da glucose, utilizando uma solução mãe com 5 mg de glucose em 1ml de etanol a 80%. Usou-se a seguinte recta de calibração: $y = 0,0003x + 0,135$ com um r^2 de 0,9889.

3.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE AMIDO

Determinou-se a concentração de amido de acordo com o protocolo de Osaki et al. (1991) com algumas alterações. Ao resíduo resultante da extração dos AST adicionaram-se 5ml de ácido perclórico, a 30%. Colocou-se o homogeneizado num banho a 60°C durante 1 hora e de seguida arrefeceu-se em gelo durante cerca de 10 min. Agitaram-se as amostras no vórtex e de seguida centrifugaram-se durante 10 minutos a 10 000g e a 4°C. Retiraram-se 30µl do sobrenadante e adicionaram-se 0,75 ml de uma solução de antrona (40 mg de antrona dissolvida em 20ml de ácido sulfúrico e 1ml de água destilada). A solução resultante colocou-se durante 10 minutos num banho a 100°C e de seguida, para parar a reação colocou-se em gelo durante 15 minutos. A leitura da absorvância do sobrenadante realizou-se com um comprimento de onda de 625nm num espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific spectrophotometer, Genesys 10-uvS. Para o branco utilizou-se uma solução de 0,75ml de antrona com 30µl de ácido perclórico, a 30%. Determinou-se a concentração de amido a partir da curva padrão da glucose, utilizando uma solução mãe de 5 mg de glucose em 1ml de ácido perclórico, a 30%. Usou-se a seguinte recta de calibração: $y = 0,0002x + 0,1502$ com um r^2 de 0,9935.

3.3.6. ANÁLISE DE DADOS

A análise dos dados fisiológicos foi feita através da análise de variâncias (One-way ANOVA) seguido do teste de Holm-Sidak (teste de comparação múltipla). Todas as análises foram feitas usando o software Sigma Stat para Windows (versão 3.1). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão.

3.3.7. ANÁLISE DO PERFIL DE VOLÁTEIS

3.3.7.1. FIBRAS DE MICRO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

Para a extração de compostos voláteis podem ser usadas várias fibras comerciais. No entanto, de acordo com trabalhos experimentais anteriormente realizados e segundo recomendações do fornecedor a fibra escolhida foi uma PDMS/DVB, 65 μ m, revestida com divinilbenzeno/polidimetilsiloxano como a indicada na figura 7.

3.3.7.2. EXTRACÇÃO HS-SPME E GC-IT-MS

Para a análise do perfil de voláteis de *E. globulus* recolheram-se folhas frescas (aproximadamente 3 folhas/planta), misturaram-se as folhas de todas plantas de forma a ficar uma distribuição homogénea, cortaram-se em pequenos fragmentos, e colocaram-se em *vials* (Anexo 13). A extração SPME (*Solid Phase Micro Extraction*) foi feita através de HS (*headspace*).

Os *vials* que continham as amostras de *E. globulus* foram colocados no amostrador automático CombiPAL (Varian, Palo Alto, CA) para iniciar a extração HS-SPME. Numa fase inicial, as amostras passaram a uma etapa de pré-incubação onde foram agitadas a 500rpm, durante 5 minutos, a 60°C. Após esta fase a fibra headspace foi introduzida no vial durante 45min, a 250rpm e a uma temperatura de 60°C. De seguida a fibra foi recolhida para dentro do *holder* da agulha, o dispositivo de SPME foi destacado do vial e foi diretamente inserido no injetor do GC (Cromatografia gasosa) para iniciar o processo de dessorção térmica durante 4 minutos. Após este tempo a fibra foi removida e acondicionada a 250°C durante 10 minutos.

A análise no GC-MS foi realizada com um cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 acoplado a um detetor de massa seletivo *ion-trap* Varian Saturn 4000 e análise foi acompanhada com o software Saturn GC/MS versão 6.8. e foi usada uma coluna VF-5MS (Varian: VF-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m).

A porta do injetor foi aquecida a 220°C e as injeções foram feitas no modo splitless. Como gás transportador foi usado hélio C-60 (Gasin, Portugal), com um fluxo constante de 1ml/min. O

forno do GC foi programado para atingir 40°C durante 1 minuto e aumentar 5°C/min até atingir 250°C. Quando atingiu a temperatura máxima (250°C) manteve durante 20 minutos.

Todos os espectros de massa foram obtidos através do modo EI (*Electron Ionization*). A ionização só foi iniciada após o primeiro minuto. As temperaturas do detetor *Ion Trap* foram as seguintes: 280°C (linha de transferência), 50°C (conduta de distribuição) e 180°C (armadilha). A massa variou entre 50 a 600 m/z e a velocidade dos scans foi de 6 scan/s. A corrente de emissão usada foi de 50 μ A e o multiplicador de eletrões foi definido no modo relativo para realizar um procedimento auto tune. O tempo máximo de ionização foi de 25 000 μ s com um nível de armazenamento de ionização de 35 m/z . As análises foram realizadas no modo Full Scan.

3.3.7.3. ANÁLISE DE DADOS DO PERFIL DE VOLÁTEIS

A análise de compostos voláteis foi feita por comparação dos tempos de retenção e espectros de massa dos picos já identificados na bibliografia para esta espécie de eucalipto, por comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos com os de padrões anteriormente analisados nas mesmas condições, e também com os espectros de massa presentes na biblioteca de dados NIST14. Para a identificação dos compostos também foram tidos em conta os respetivos índices (kovats).

a) ANÁLISE MULTIVARIADA ‘UNTARGETED’

A análise multivariada foi aplicada a 26 cromatogramas relativos a 9 amostras de plantas de *E. globulus*, analisadas em triplicado, podendo as amostras ser divididas em 3 grupos: Controlo (C), 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). Devido a um erro sistemático, um dos triplicados foi eliminado.

O tratamento dos dados cromatográficos foi feito pelo modo ‘*untargeted*’. Para cada amostra, extraiu-se o ficheiro ASCII que continha todos os dados cromatográficos, a partir do qual foi criada uma matriz com todos os dados espectrais. Todas as matrizes foram importadas para o programa Matlab (versão R2009b) para se proceder ao alinhamento automático dos cromatogramas e usaram-se os espectros de massa para confirmar a identidade dos picos. Este procedimento foi usado devido às diferenças nos tempos de retenção das múltiplas amostras devido a diferenças analíticas. De seguida, a matriz foi sujeita a scaling (variância unitária) e, posteriormente, foi aplicado o método dos mínimos quadrados parciais para análise discriminante (PLS-DA) (Anexo 2) com o objetivo de diferenciar os grupos amostrais (C, S1 e S11). Foi usado o software SIMCA-P (versão 13.0.3), onde os valores Q_2 e R_2 representam, respetivamente, a capacidade de previsão e a variância explicada.

A análise de dados através de PLS-DA é um processo supervisionado e usado na classificação, uma vez que integra a informação acerca das classes, a fim de ampliar a sua separação. O objetivo é fazer varias contagens dispersas, onde cada ponto representa amostras individuais e as amostras semelhantes são agrupadas em *clusters*.

Para a análise *untargeted*, os *loadings* foram obtidos pela multiplicação de cada variável através do seu desvio padrão e foram atribuídas cores de acordo com a importância da projeção de cada variável (VIP) (Anexo 3 e 4). Só os compostos com valores de VIP superiores a 1.06 (para o componente 1) e superiores a 1.12 (para o componente 2) foram considerados para a análise estatística univariada.

b) ANÁLISE ESTATÍSTICA UNIVARIADA

A comparação estatística dos níveis de metabolitos entre os grupos (C, S1 e S11) foi feita através do teste de Mann-Whitney (teste não paramétrico). As diferenças com um $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. A representação em gráfico de barras com o respetivo desvio-padrão foi usada para visualizar a variação dos diferentes metabolitos selecionados entre as amostras de *E. globulus* (C, S1 e S11). Os testes estatísticos e respetivos gráficos foram efetuados usando o software GraphPad Prism (versão 6.07) (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. ANÁLISES FISIOLÓGICAS

3.4.1.1. PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

A aplicação de radiação UVB nas plantas de eucalipto não afetou a concentração de clorofila *a* 1 dia após o stress (S1) ($P \geq 0.05$) (Figura 13) no entanto, 11 dias após o final do stress (S11), a concentração de clorofila *a* desceu (26%) e atingiu valores inferiores aos do controle ($P \leq 0.05$) (Figura 13).

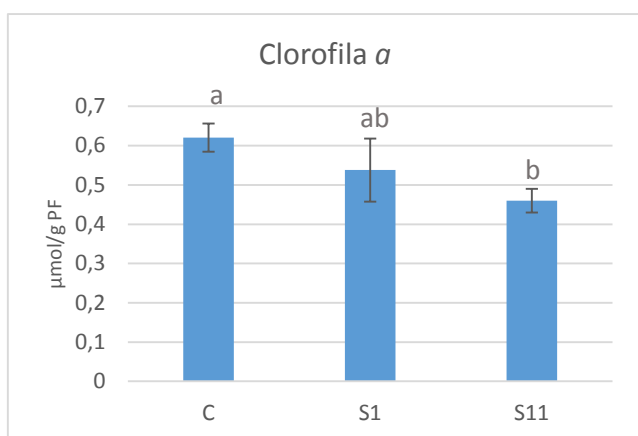


Figura 13 - Conteúdo em Clorofila *a* em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

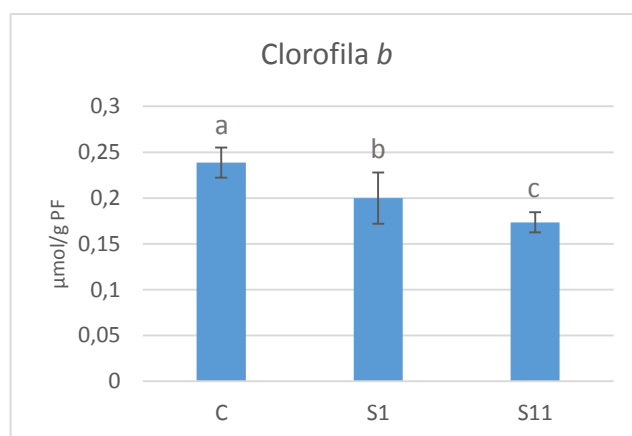


Figura 14 - Conteúdo em Clorofila *b* em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

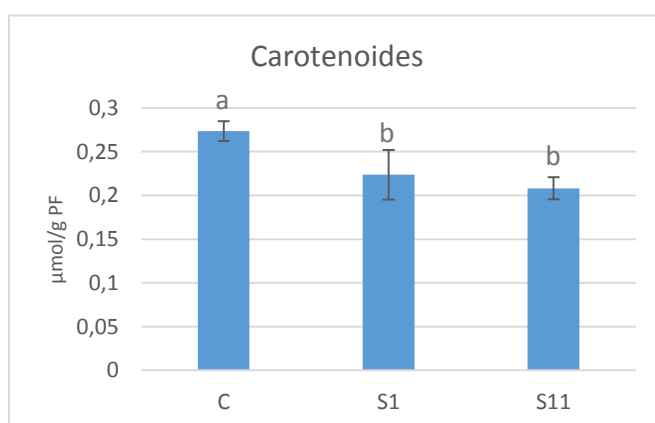


Figura 15 - Conteúdo em carotenóides em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Contudo foi registada uma redução significativa da concentração de clorofila *b* nas plantas expostas a stress (1 e 11 dias após o stress) por UVB em relação às plantas controlo (C). Após 11 dias houve uma redução na concentração de clorofila *b* que era estatisticamente inferior concentração de clorofila *b* nas plantas após 1 dia (Figura 14).

O controlo (C) apresentou uma concentração mais elevada de carotenoides em relação a S1 e S11 ($P \leq 0.05$) (Figura 15). A concentração de carotenoides nas plantas de eucalipto após 1 dia e após 11 dias do final da exposição ao stress de UVB era semelhante ($P \geq 0.05$) (Figura 15).

3.4.1.2. CONCENTRAÇÃO DE HIDRATOS DE CARBONO

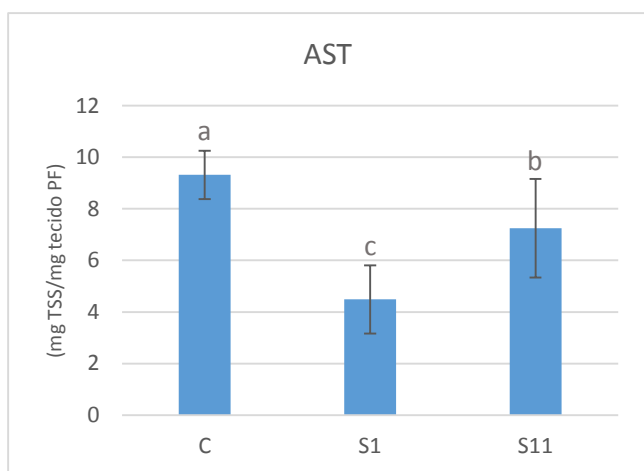


Figura 16 - Conteúdo em Açúcares Solúveis Totais (AST) em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

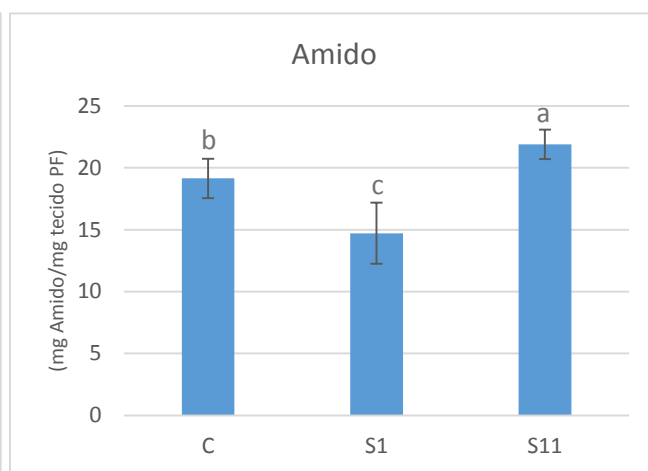


Figura 17 - Conteúdo em Amido em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Um dia após o final do stress a concentração de TSS era 52% inferior à do controlo ($P \leq 0.05$). Contudo, 11 dias após o final do stress a concentração de TSS manteve-se inferior à do controlo ($P \leq 0.05$) mas superior ao valor encontrado para 1 dia após o final do stress (Figura 16).

À semelhança do observado para o TSS, também a concentração de amido desceu significativamente 1 dia após o final do stress (23%) (Figura 17). Contudo, houve uma subida acentuada da concentração de amido 11 dias após o final do stress, atingindo valores superiores ao controlo ($P \leq 0.05$).

3.4.1.3. TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a*

Não se observaram diferenças significativas entre as plantas de eucalipto em condições de

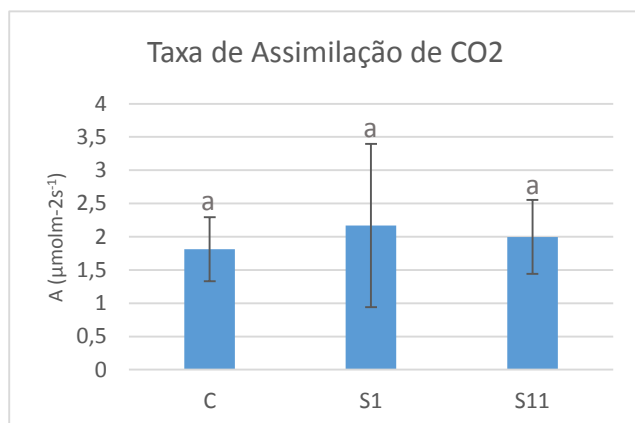


Figura 18 - Taxa de Assimilação de CO₂ em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

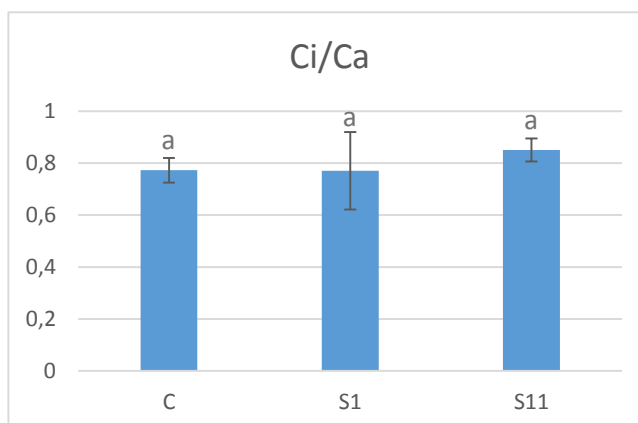


Figura 19 - Rácio entre a concentração intercelular de CO₂ e a concentração intracelular de CO₂ em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

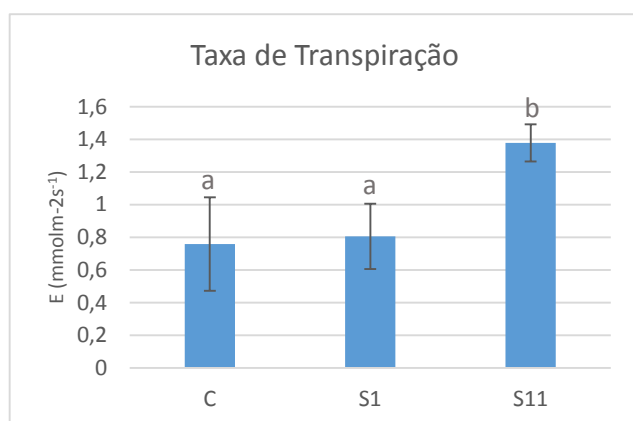


Figura 20 - Taxa de Transpiração em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

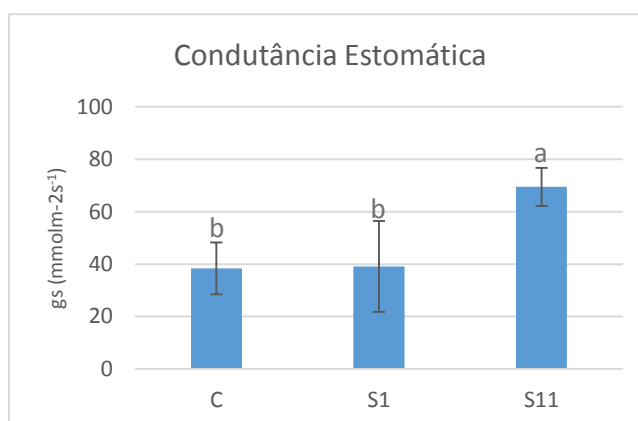


Figura 21 - Condutância Estomática em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

controle e expostas a stress (1 e 11 dias após o final do stress) na taxa de assimilação de CO₂ e no rácio da concentração intercelular de CO₂ e ambiente de CO₂ (Figuras 18 e 19).

Em relação à taxa de transpiração e à condutância estomática, nas plantas de eucalipto 1 dia após o stress apresentaram valores semelhantes às plantas do controle (Figuras 20 e 21). Contudo, 11 dias após o final do stress tanto a transpiração como a condutância estomática aumentaram significativamente em relação a S1 e ao C.

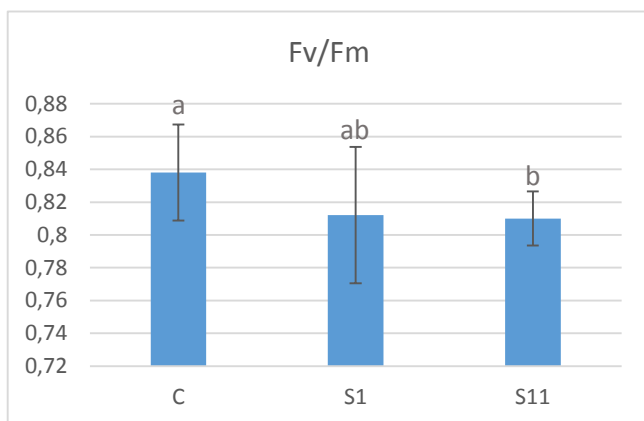


Figura 22 - Fv/Fm em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

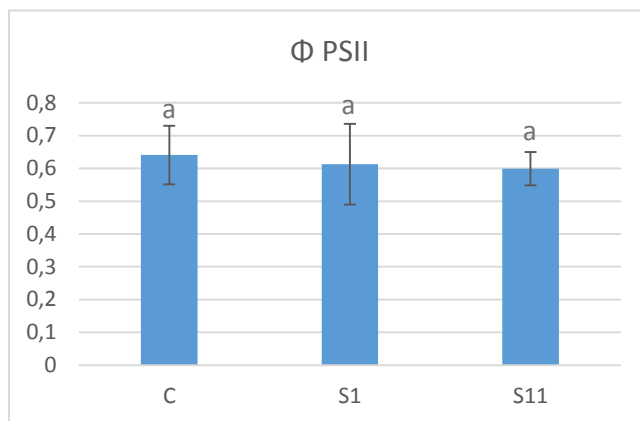


Figura 23 – Φ PSII em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Não se observaram diferenças significativas no Fv/Fm entre as plantas de controle e S1 (Figura 22). Contudo, o Fv/Fm nas plantas S11 foi inferior ao do controle ($P \leq 0.05$). Não se observaram diferenças significativas no PSII nas plantas em condições C, S1 e S11 (Figura 23).

3.4.2. ANÁLISE DO PERFIL VOLÁTIL

3.4.2.1. TERPENOS

A aplicação de radiação UVB nas plantas de eucalipto, em geral, provocou alterações nas quantidades de terpenos. Foi registada uma descida significativa das concentrações de α -Phellandrene, α -Thujene, O-Cimene, α -Terpineol e do terpeno não identificado em relação às plantas controle, 1 e 11 dias após a exposição (Figuras 24-26, 30, 31). Em relação aos compostos isoterpinolene e β -cis-Ocimene, apesar de se observar uma oscilação nas suas concentrações após a exposição a UVB não se registaram diferenças significativas face ao controle (Figuras 27,28). Um dia após o final do stress, verificou-se um aumento significativo do Eucalyptol, em relação ao controle e a S11 (Figura 29).

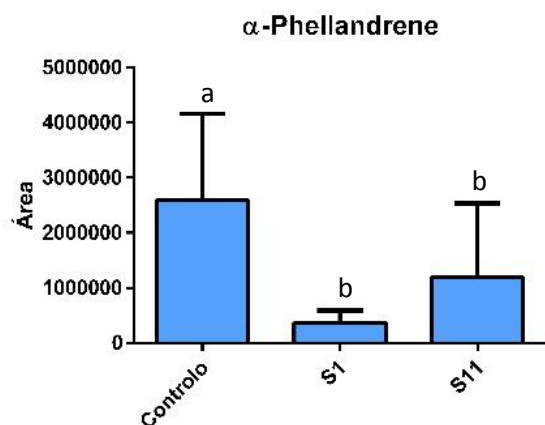


Figura 24 – Variação de α -Phellandrene em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

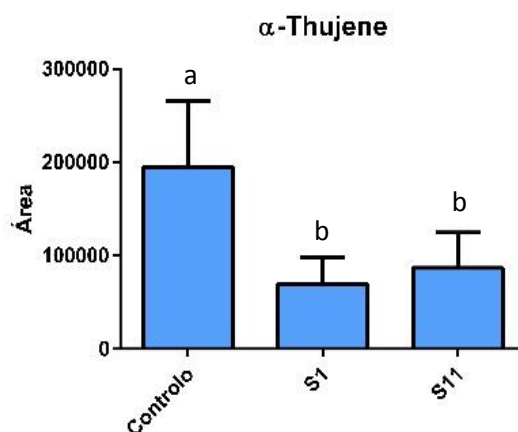


Figura 25 - Variação de α -Tujene em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

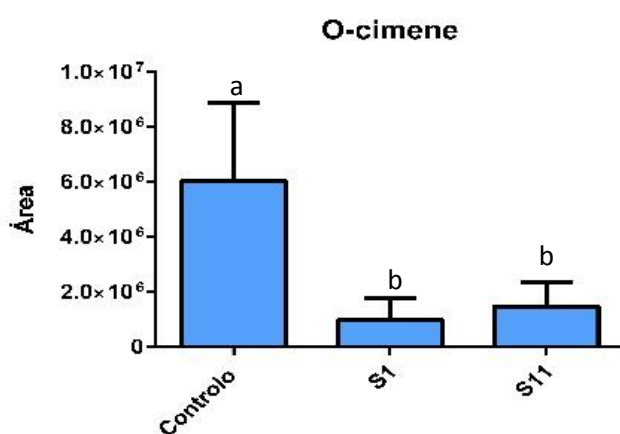


Figura 26 - Variações de O-cimene em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

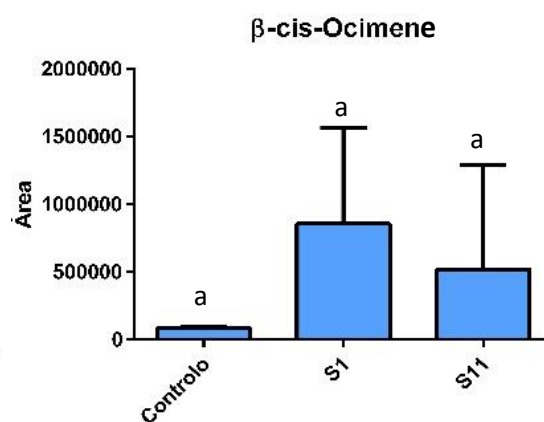


Figura 27 - Variações de β -cis-Ocimene em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

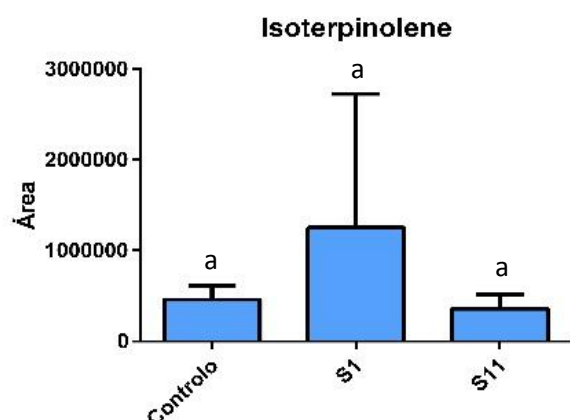


Figura 28 - Variações de Isoterpinolene em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

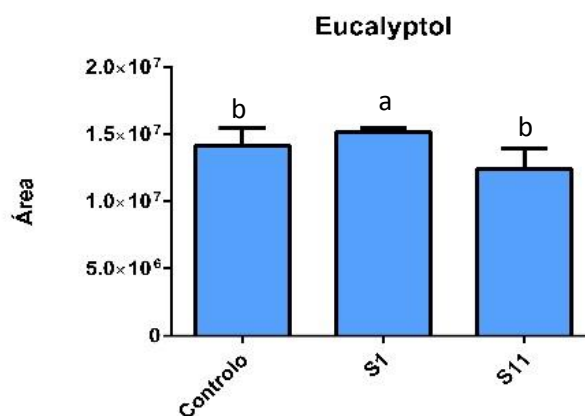


Figura 29 - Variações do Eucalyptol em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

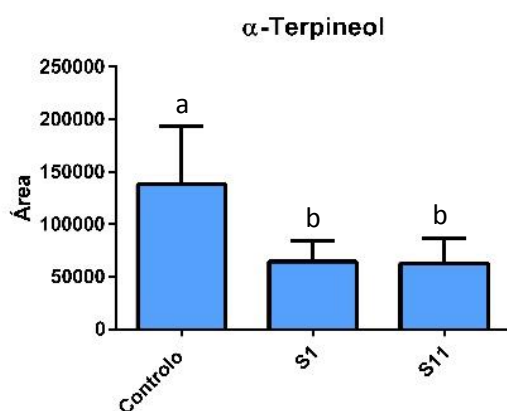


Figura 30 - Variações do α -Terpineol em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

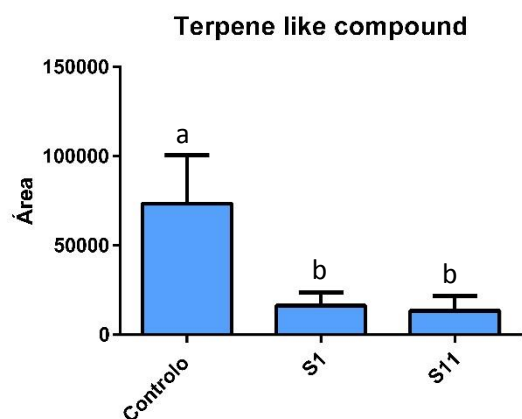


Figura 31 - Variações do terpeno não identificado em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

3.4.2.2. SESQUITERPENOS

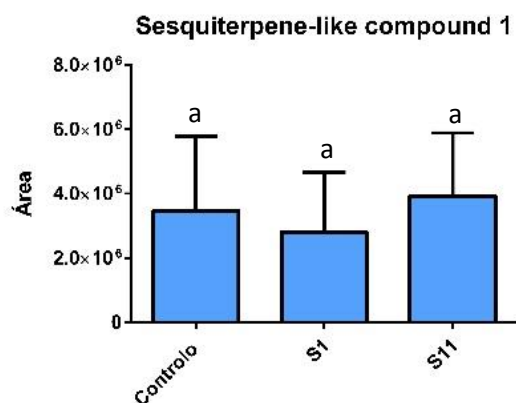


Figura 32 - Variação no Sesquiterpeno 1 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

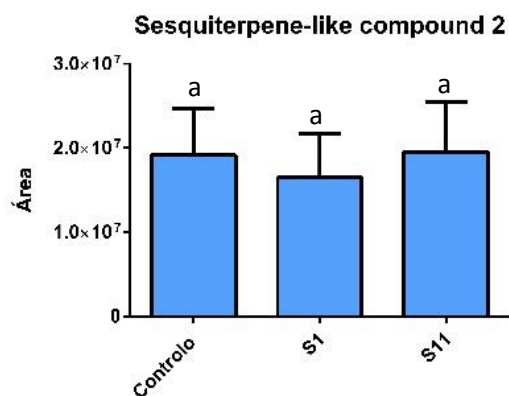


Figura 33 - Variação no Sesquiterpeno 2 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

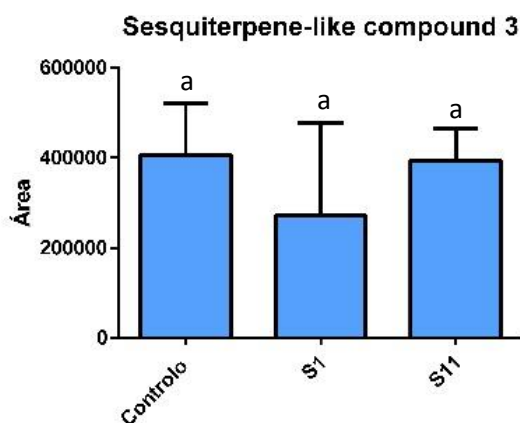


Figura 34 - Variação no Sesquiterpeno 3 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

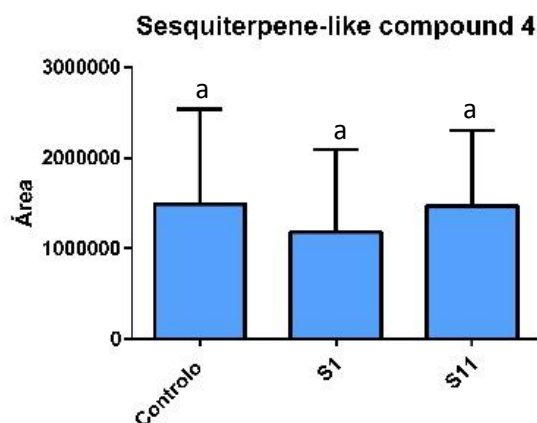


Figura 35 - Variação no Sesquiterpeno 4 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

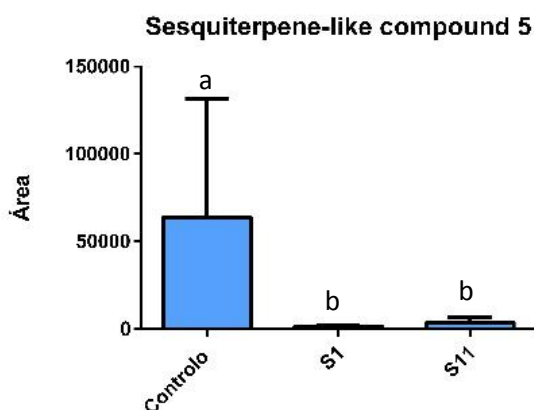


Figura 36 - Variações no Sesquiterpeno 5 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

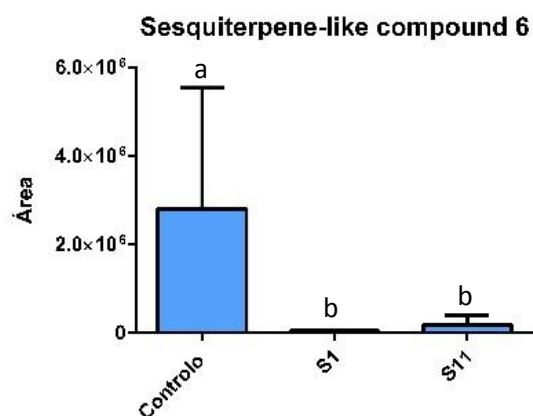


Figura 37 - Variações no Sesquiterpeno 6 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

O perfil de sesquiterpenos encontrado nas plantas de eucalipto foi bastante heterogêneo. Para o caso dos sesquiterpenos 1, 2, 3 e 4, apesar de pequenas variações nas suas quantidades estes não sofreram qualquer alteração significativa após a aplicação da radiação UVB (Figuras 32-35).

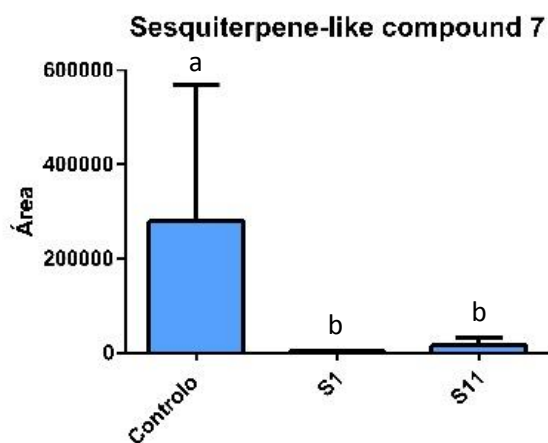


Figura 38 - Variações no Sesquiterpeno 7 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

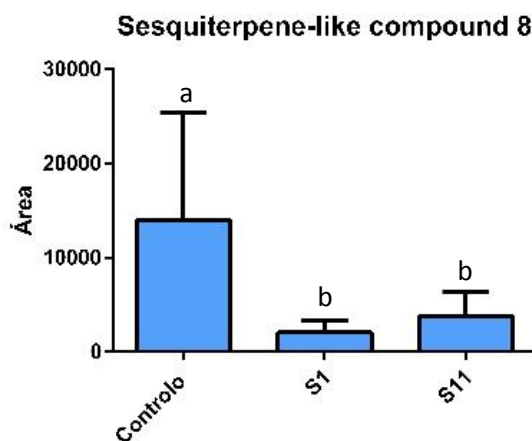


Figura 39 - Variações no Sesquiterpeno 8 em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

No caso dos sesquiterpenos 5, 6, 7 e 8 as quantidades destes metabolitos desceram significativamente, 1 dia após a aplicação da radiação UVB e mantiveram-se nestas quantidades 11 dias após o final da exposição a UVB (Figuras 36-39).

3.4.2.2. ALDEÍDOS

Não se observaram diferenças significativas entre as quantidades de benzaldehyde nas plantas de controlo e nas plantas expostas a UVB (S1 e S11) (Figura 40). Contudo, a quantidade deste metabolito foi estatisticamente superior 1 dia após a exposição a UVB (S1) relativamente a 11 dias após a aplicação da radiação UVB (S11).

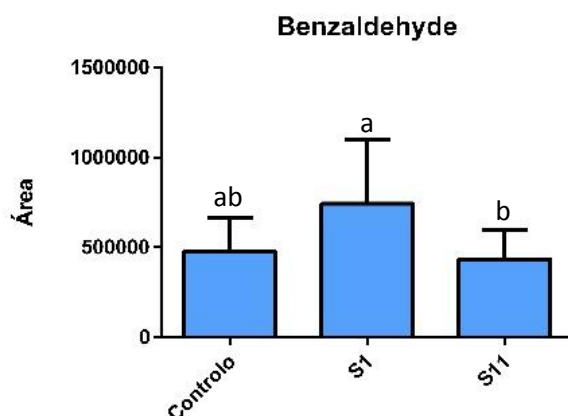


Figura 40 - Variação do Benzaldehyde em plantas de *E. globulus* em condições de C, 1 dia após o final do stress (S1) e 11 dias após o final do stress (S11). As barras representam médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos.

3.5. DISCUSSÃO

3.5.1. ANÁLISES FISIOLÓGICAS

As previsões do painel intergovernamental para as alterações climáticas apontam para um aumento das ocorrências de períodos de seca acompanhados de elevados níveis de radiação UV e aumento da temperatura (IPCC 2007). Assim, compreender a tolerância das plantas ao stress, neste caso particular a radiação UVB, é essencial para otimizar a gestão florestal e as técnicas de melhoramento perante um cenário de alterações climáticas. Tem sido reportado que a radiação UVB atua como uma fonte geradora de stress, afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas. Vários estudos relatam que a exposição a UVB pode desencadear, por exemplo, a síntese de novos compostos, aumento da capacidade antioxidante, aumento de compostos fenólicos, o que muitas vezes pode ser interpretado como uma desvantagem (afeta negativamente a *performance* da espécie) ou como uma vantagem (melhora a qualidade dos alimentos) (Reboredo e Lidon 2012).

A exposição de plantas de eucalipto com três meses de idade a uma radiação de 12 kJ m² (6 kJ m² d⁻¹) não influenciou a sua taxa de sobrevivência. Morfologicamente, não se observaram

diferenças entre as plantas de controlo e as que foram expostas a UVB (no tempo S1 e S11). A não variação destes parâmetros sugere alguma tolerância do eucalipto a esta dose de radiação UVB.

À semelhança do que acontece para outras espécies de plantas expostas a défice hídrico (ex. Dias et al. 2014a e 2014b) e temperaturas elevadas (Silva et al. 2010), o aparelho fotossintético é também um dos principais alvos da radiação UVB (Hollosy 2002). O stress por UVB atua diretamente no fotossistema II (PSII) e na atividade e conteúdo da enzima RuBisCo provocando uma diminuição da fotossíntese (Hollosy 2002). Contudo, a dose de radiação de UVB usada neste trabalho não induziu alterações na taxa de assimilação de CO₂ nas plantas de eucalipto. Sangtarash et al. (2009) estudaram o efeito da aplicação de uma dose de UVB superior à estudada neste trabalho, 10 kJ m⁻² d⁻¹, em *Brassica napus* durante 10 dias. Ao fim de 5 dias de exposição, a taxa de assimilação de CO₂ também não foi alterada e só ao fim de 10 dias é que se observou uma ligeira descida. Em plantas de *Oryza sativa* expostas a uma dose total de 21 kJ m⁻² (3 kJ m⁻² d⁻¹ durante 7 dias), Lidon e Ramalho (2011) já observaram uma descida acentuada da taxa de assimilação de CO₂. Também em plantas de *Vigna unguiculata* expostas a várias doses de UVB (5,10 e 15 kJ m⁻² d⁻¹) a taxa de assimilação de CO₂ diminuiu (Surabhi et al. 2009). A exposição de oliveira a 0,47 W m⁻² de UVB durante um período de seca teve um efeito negativo nas relações hídricas, fotossíntese (taxa de assimilação de CO₂) e crescimento (Nogués et al. 1999). Também Liakoura et al. (1999) expuseram plantas de oliveira (*Olea europaea*) a várias doses de radiação UV (1,78; 3,30; 5,21 e 6,93 kJ m⁻² d⁻¹) e observaram algumas alterações na eficiência fotossintética (Fv/Fm), contudo concluíram que a quantidade de radiação usada não era suficiente para causar danos significativos nas plantas.

O fecho estomático é uma das principais causas da redução da fotossíntese em plantas expostas a stress hídrico (Dias 2005). A redução da abertura estomática previne a perda de água mas ao mesmo tempo pode também diminuir a entrada de CO₂ e consequentemente pode decrescer a taxa de assimilação de CO₂ (Dias 2005). Nogués et al. (1999) demonstraram também que elevadas doses de radiação UVB têm um efeito direto na abertura estomática de várias espécies, por exemplo, na ervilheira. Também Lidon e Ramalho (2011) observaram que uma dose de 21 kJ m⁻² de UVB induzia a redução da abertura estomática em plantas de *O. sativa*. Contudo, neste trabalho efeitos estomáticos (*g_s* e *E*) não foram observados nas plantas de eucalipto depois da exposição a UVB (S1) e até se observou um aumento da abertura estomática (*g_s* e *E*) 11 dias depois do final da exposição a UVB (S11).

Um dos principais produtos da fotossíntese são os açúcares (Pinheiro e Chaves 2011). Uma análise dos resultados mostra que a exposição das plantas de eucalipto a UVB diminui tanto a concentração de açúcares solúveis (glucose, sacarose, frutose, etc.) como a concentração de

amido (para o tempo S1). Assim, estes resultados demonstram que em condições de stress por UVB as plantas de eucalipto consomem mais AST do que os produzidos através da fotossíntese e até recorrem aos açúcares de reserva, o amido. Esta diminuição de hidratos de carbono (AST e amido) pode estar relacionada com o aumento das necessidades da planta para manter processos energéticos importantes para o crescimento e manutenção da planta após a exposição a radiação UVB. Esta hipótese pode ser apoiada pelo aparente crescimento similar (altura) das plantas em condições de C e stress (S1 e S11).

A radiação UVB afeta diretamente o funcionamento do fotossistema II (PSII) enquanto que o fotossistema I (PSI) e o citocromo b/f parecem ser as partes menos afetadas da membrana do tilacoide (Cen e Borman 1990 *vide* Hollosy 2002). A avaliação da fluorescência da clorofila *a* é uma ferramenta útil para o estudo das respostas fisiológicas das plantas a diferentes stresses (ex. Lidon e Ramalho 2011, Silva et al. 2010, Dias et al 2014a). A fluorescência da clorofila *a* é usada como indicador de stress, sendo a relação F_v/F_m um dos parâmetros mais importantes pois é um indicador da eficiência fotossintética da planta. O Φ_{PSII} é também um parâmetro importante pois dá indicação da proporção de energia que é absorvida pela clorofila (associada ao PSII) e que está a ser utilizada para a fotoquímica (Maxwell e Johnson 2000). Relativamente à fluorescência da clorofila *a* em eucalipto verificou-se que um dia após o fim da exposição (S1) a UVB tanto o F_v/F_m como o Φ_{PSII} não foram afetados. Contudo, 11 dias após o final da exposição a UVB notou-se uma pequena descida do F_v/F_m , mas de um modo geral, os valores do F_v/F_m medidos estão dentro dos valores referidos para plantas saudáveis (0,75-0,85) (Dias et al. 2013).

Os principais pigmentos fotossintéticos presentes nas plantas são a clorofila *a* e *b*, e os carotenoides. A clorofila *a* funciona como pigmento fotossintético primário e a clorofila *b* e os carotenoides são pigmentos fotossintéticos acessórios. Para além disso, os carotenoides têm um papel muito importante de fotoproteção, protegem a clorofila contra danos foto-oxidativos (Taiz e Zeiger 1998). A radiação UVB afeta adversamente o conteúdo de clorofilas e carotenoides, mas os carotenoides parecem ser mais resistentes a este stress do que as clorofilas (Hollosy 2002). Por sua vez, Marwood e Greenberg 1996 *vide* Hollosy 2002, demonstraram que a radiação UVB é mais nociva para a clorofila *b* do que para a *a*. Estes autores concluíram que a radiação UVB afeta a biossíntese da clorofila *b* e/ou degrada os precursores deste pigmento. Boeger e Poulson (2006) aplicaram uma radiação de $6 \text{ kJ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em plantas de *Arabidopsis thaliana* e verificaram um aumento da concentração total de clorofilas (*a* e *b*).

Neste estudo, notou-se que a aplicação da radiação UVB em eucalipto induzia uma pequena redução do conteúdo de clorofila *a* e que essa redução era apenas significativa 11 dias após o final da exposição. Já a concentração de clorofila *b* e carotenoides foi diminuindo

progressivamente após a aplicação da radiação UVB. Estes resultados também confirmam que a clorofila *a* é menos afetada do que a *b*.

À semelhança do que aconteceu em eucalipto, a concentração total de clorofila desceu após a exposição de plantas de *V. unguiculata* a 5, 10 e 15 kJ m⁻² d⁻¹ de UVB e também não se registaram alterações ΦPSII (Surabhi et al. 2009). Lidon e Ramalho (2011) também registaram uma redução na concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*) em *O. sativa* expostas a uma dose total de UVB de 21 kJ m⁻² mas esta redução foi acompanhada de uma descida do Fv/Fm e do ΦPSII.

De um modo geral, pode-se dizer que a dose de UVB usada não induziu danos fisiológicos significativos em eucalipto: não afetou as reações fotoquímicas nem as trocas gasosas, contudo notaram-se algumas alterações a nível do metabolismo do carbono (AST e amido) e no conteúdo de pigmentos. Algumas destas alterações permaneceram até 11 dias após o final da exposição (TSS e pigmentos).

3.5.2. PERFIL DE VOLÁTEIS

Neste trabalho, a maior parte de compostos voláteis encontrados nas folhas jovens de eucalipto pertencem às famílias dos terpenos, sesquiterpenos e aldeídos. Não foram encontrados nestas folhas compostos fenólicos, descritos na literatura como sendo um dos principais grupos de compostos normalmente encontrados nas folhas de eucalipto, juntamente com os terpenos (Gilles et al. 2010). Este facto pode dever-se ao tipo de coluna usada, e/ou método/condições de extração, que não permitiram visualizar compostos fenólicos adequadamente.

Deverá na análise destes perfis, ter-se em consideração a influência das condições das plantas e a idade das folhas para a deteção dos compostos em causa. De facto óleos essenciais extraídos de folhas jovens de *E. globulus* tendem a apresentar essencialmente compostos monoterpénicos hidrocarbonados enquanto que o óleo das folhas desenvolvidas tendem a aumentar os monoterpénos oxigenados (Silvestre et al. 1997). Spinelli et al. (2011) sugerem que as folhas jovens são mais importantes para a planta do que as folhas desenvolvidas, pois maiores quantidades de terpenos são encontradas nas folhas jovens.

As condições ambientais também afetam esta composição. Por exemplo, McKiernan et al. (2014) verificaram que ao exporem plantas de eucalipto (*E. globulus* e *E. viminalis*) à seca, a maioria dos terpenos, embora não sendo significativamente afetados, apresentavam uma tendência para baixar.

Também alterações sazonais podem afetar o rendimento da produção de óleos em eucalipto (Silvestre et al. 1997). Este facto levanta a questão de averiguar se stresses associados a alterações climáticas, em particular a radiação UVB, poderão influenciar o perfil de voláteis. No

caso do eucalipto, não se conhecem ainda os efeitos que o aumento da radiação UVB pode ter no metabolismo secundário desta espécie.

Independentemente do stress aplicado, os compostos de *E. globulus* encontrados neste trabalho pertenceram às famílias dos terpenos, sesquiterpenos e aldeídos, tendo contudo variado a concentração de alguns destes compostos. Em geral, os sesquiterpenos não sofreram alterações, contudo em alguns casos apresentavam uma tendência para diminuir com o stress, enquanto o grupo dos aldeídos não sofreu alterações significativas. O grupo dos terpenos apresentou, de uma forma geral, tendência para diminuir, no entanto alguns terpenos não sofreram alterações. Já o eucalyptol foi o único terpeno que apresentou tendência para aumentar, um dia após o final do stress.

Os terpenóides ou terpenos são conhecidos principalmente por serem constituintes primários dos óleos essenciais. Apresentam uma fórmula química geral $(C_5H_8)_n$ e são biossintetizados pela via do mevalonato. O isopreno é a unidade básica principal da família dos terpenos e é produzido através do precursor DMAPP (dimethylallyl diphosphate) e do seu isómero IPP (isopentenyl diphosphate). Esta molécula é sintetizada pela via DXP (deoxyxylulose-5-phosphate) no cloroplasto, e pela via do mevalonato no citoplasma (Spinelli et al. 2011). O IPP pode condensar com uma, duas ou três moléculas de DMAPP para formar GPP (geranyl pyrophosphate) (precursor dos monoterpenos), FPP (farnesyl pyrophosphate) (precursor dos sesquiterpenos) ou GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate) (precursor dos diterpenos) (Figura 41) (Spinelli et al. 2011). A estrutura primária dos terpenos deriva de unidades isoprénicas compostas por cinco carbonos que estão ligados entre si tipo “head-to-tail” para formar cadeias lineares ou anéis. Os terpenos podem ser encontrados como derivados oxigenados tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres ou ácidos carboxílicos.

Várias espécies de eucalipto, inclusive o *E. globulus*, são usados para a produção de óleos essenciais. Os terpenos são constituintes muito importantes do óleo de eucalipto, pois são eles os responsáveis pelo odor característico desta espécie. Contudo, as folhas expandidas têm, em geral, maior quantidade de terpenos oxigenados (Silvestre et al 1997).

O 1,8-Cineol ou Eucaliptol representa 80% da composição total dos óleos essenciais nas espécies de Eucalipto. Este composto tem uma grande importância industrial pois é muito usado nas indústrias farmacêuticas e alimentares (como aromatizante e intensificador de sabor) (Külheim et al. 2015). Este estudo revelou que a dose de radiação UVB usada, em geral, não alterou o perfil deste metabolito, com exceção de S1, onde se verificou um ligeiro aumento.

Os terpenos são compostos importantes para a biologia das plantas e a sua defesa a stresses ambientais, desempenhando sobretudo funções de proteção (ex. proteção da fotossíntese após stress térmico e face a stress oxidativo) e na defesa direta e indireta na herbívoros (Spinelli et al.

2011). Os terpenos também atuam como protetores quando a planta apresenta alguma lesão externa. Quando os tecidos da planta entram em contacto com o ar, alguns terpenos evaporam formando uma camada semi-rígida que atua como uma película protetora (Spinelli et al. 2011). A emissão de terpenos aumenta com o aumento de temperatura (stress normalmente associado a UVB numa situação de alterações climáticas). Este aumento pode estar relacionado com o estímulo, pela temperatura, de atividades enzimáticas da via de síntese dos voláteis (Spinelli et al. 2011).

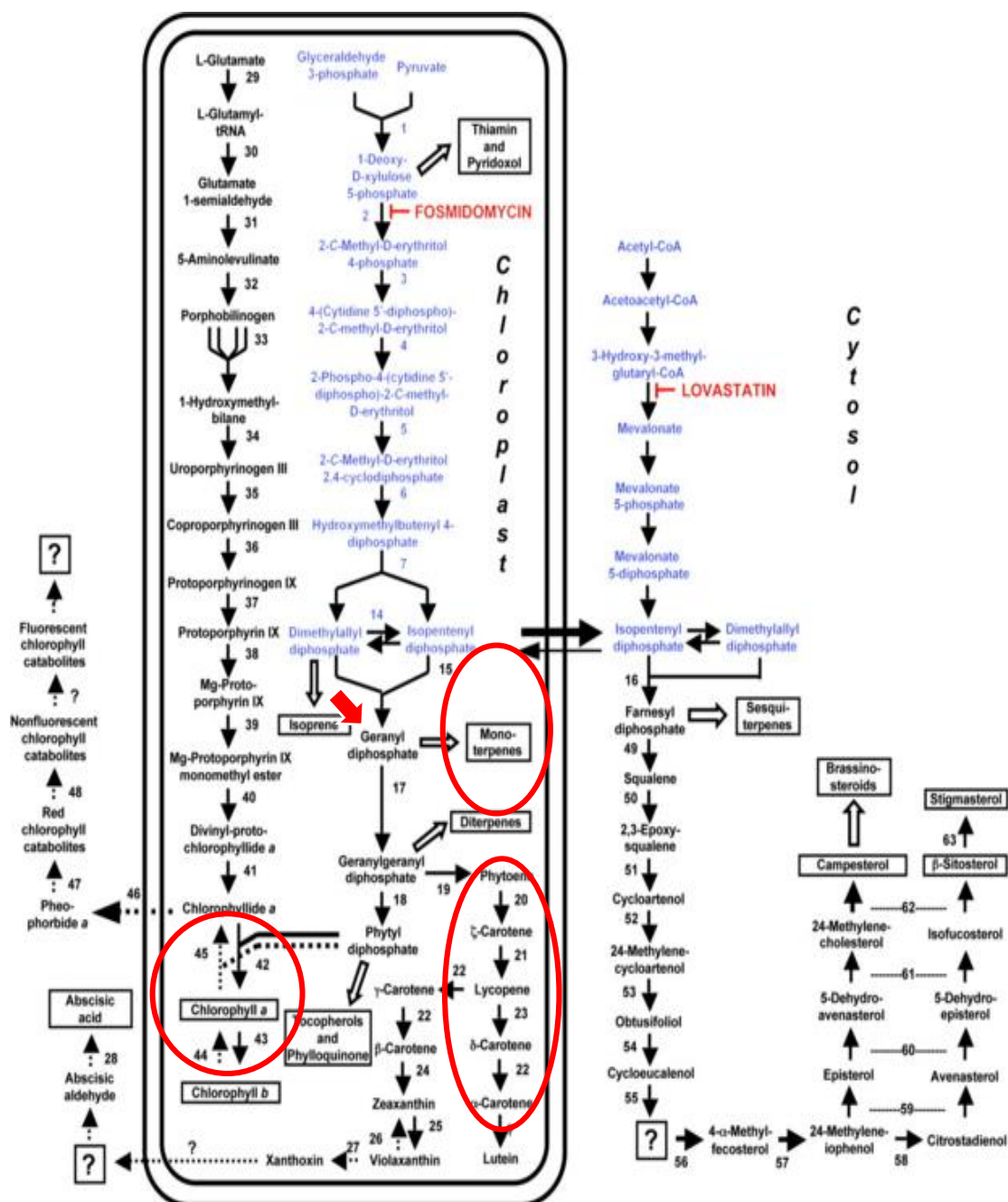


Figura 41 - Vias metabólicas dos terpenos situadas no citoplasma e cloroplasto de plantas com ênfase no metabolismo das clorofilas, cloroplastos e esteróis (via do GPP) (retirado de Laule et al. 2003).

Os sesquiterpenos apresentam propriedades protetoras mas também reagem rapidamente a flutuações nas quantidades de ozono podendo aumentar a tolerância a este stress abiótico (Palmer-Young et al. 2015). Palmer-Young et al. (2015) demonstraram que em plantas de tabaco selvagem o aumento da produção de sesquiterpenos inibiu o dano oxidativo e manteve as funções fotossintéticas da planta quando expostas a stress agudo ou crónico face a variações de ozono, radiação UVB e seca.

Os terpenos, em geral, têm demonstrado ser compostos úteis no combate da planta face aos stresses abióticos, por exemplo através da estabilização da membrana e efeitos antioxidantes. O Eucalipto é uma espécie que apresenta uma estrutura especial para acumulação de monoterpenos como por exemplo as células glandulares na superfície da folha. Os monoterpenos, como o eucaliptol, linalol e muitos outros são os principais componentes dos óleos essenciais das plantas que por outro lado estão também associados a atividades antimicrobianas e antioxidantes (Spinelli et al. 2011).

O ácido jasmónico é um composto volátil que está muito associado à exposição UVB, e rapidamente aumenta em resposta a ferimentos, défice hídrico, estimulação mecânica, eliciadores (geram respostas de defesa na planta) e também medeia algumas das respostas de defesa induzidas por radiação UVB (Spinelli et al. 2011). Sendo esta hormona (tal como o etileno) um dos agentes envolvidos na síntese de terpenos sugere-se que, no *E. globulus* a exposição a UVB poderá ter levado a um aumento destas hormonas, que por sua vez leva a um aumento de defesa não específico (aumenta a capacidade antioxidante da planta). Por outro lado, aumentos destas vias (como a do etileno) podem também levar a um aumento das vias de síntese de clorofilas (Clorofilas *a*, *b* e carotenoides).

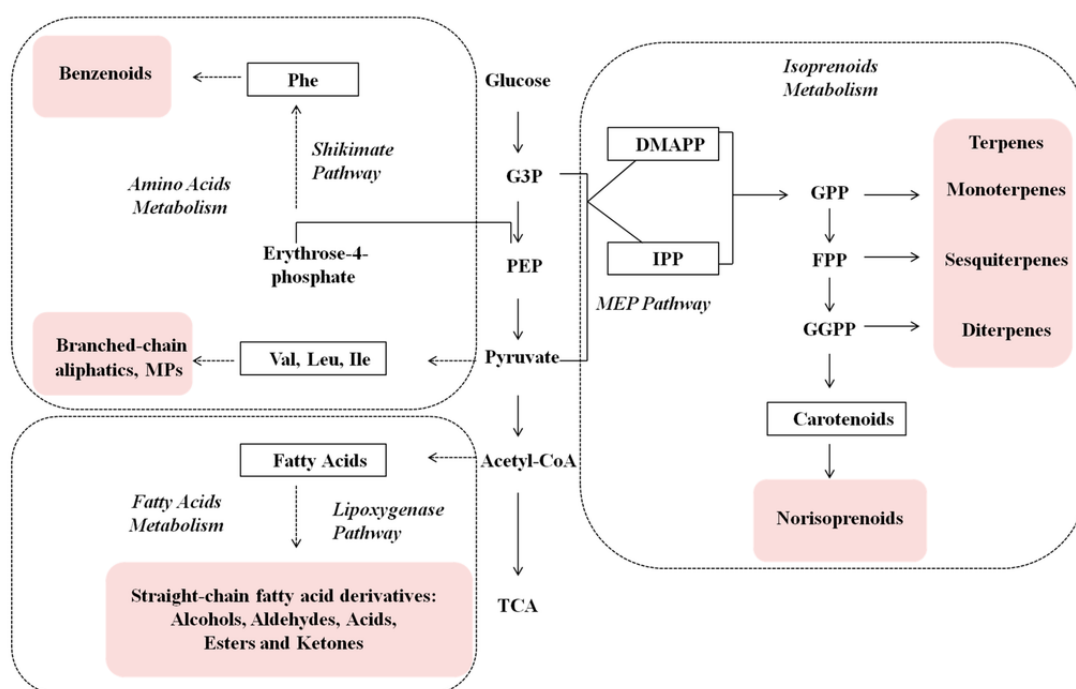


Figura 42 - Metabolismo e vias biossintéticas de 3 classes de compostos orgânicos voláteis (retângulos rosa) (retirado de Liu et al. 2015).

Em arroz, Lee et al. (2014) verificaram que a síntese de terpenos (quando há a formação de GPP em monoterpenos) foi estimulada após a aplicação de radiação UV. Sendo que o GPP é também um precursor de pigmentos (Figura 41) como as clorofilas e os carotenoides, a síntese destes pigmentos pode ser comprometida por um desvio da pool de GPP para os monoterpenos, tal como foi observado neste trabalho quando o *E. globulus* foi exposto a radiação UVB. Contudo, ressalve-se a necessidade deste potencial desvio dada a importante capacidade antioxidante destes compostos.

Os aldeídos são considerados um dos grupos funcionais com maior relevância. A amplificação dos danos provocados por ROS (espécies reativas de oxigênio, do inglês, *reactive oxygen species*) é estimulada pela acumulação de produtos de degradação, como os aldeídos resultantes das reações dos ROS com lípidos e proteínas (Sunkar et al. 2003). Muitas das respostas que induzem a defesa da planta são ativadas por jasmonatos, aldeídos C6 e derivados de ambos os compostos (AOS e HPL, respetivamente) que são produzidos através dos metabolitos pertencentes à via da oxilipina. No entanto, os papéis desempenhados por cada um destes metabolitos nas respostas diretas e indiretas de defesa da planta têm sido inconclusivas (Chehab et al. 2008). Em plantas, já foi demonstrado que o benzaldeído é formado através da transaminação da fenilalanina para fenilpiruvato (Hagel et al. 2012) (Figura 42). Rout e Senapati (2013) citam que os stresses abióticos (ex.: radiação UVB e stress térmico) causam um aumento

de ROS onde, por sua vez, a peroxidação lipídica causa um aumento de aldeídos citotóxicos, contribuindo para os danos celulares.

3.5. CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho demonstrou-se que a técnica de HS-SPME-GC-IT/MS permitiu identificar alguns dos principais compostos orgânicos voláteis nas folhas de *E. globulus* como terpenos e aldeídos. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados na literatura, embora a ausência de outros compostos (ex.: compostos fenólicos) deva ser analisada com outras abordagens de extração e análise. Também se verificou que a exposição a radiação UVB não levou à morte das plantas, nem afetou a fotossíntese mas induziu algumas alterações nos pigmentos fotossintéticos e nos hidratos de carbono (decréscimo de pigmentos e açúcares). No geral, a análise de compostos voláteis mostrou que o stress teve poucos efeitos nos sesquiterpenos assim como no benzaldeído (associado a combate a stress oxidativo). Os terpenos (associados a defesa contra stresses bióticos e abióticos) tiveram uma resposta mais heterogênea apesar da diminuição da maioria dos compostos. As variações dos compostos terpénicos podem estar associadas a alterações nas vias do GPP como resultado do stress, estimulando as defesas da planta e impedindo que haja danos maiores ao nível da fotossíntese. De facto, após a exposição a UVB, não se observaram alterações significativas nos parâmetros diretamente relacionados com a fotossíntese, tais como a A , F_v/F_m e o Φ_{PSII} , o que poderá supor uma inibição desta via metabólica. No entanto esta hipótese deverá ser averiguada em trabalhos futuros.

As alterações metabólicas induzidas pela exposição a UVB podem ser vantajosas ao nível industrial, pois estimulam a produção de alguns compostos com grande aplicação farmacêutica e/ou alimentar. Por exemplo através do cultivo de plantas em estufas com condições controladas, poder-se-á manipular a sua composição química e aumentar a produção de compostos orgânicos com elevado interesse comercial.

Capítulo 4

Resposta da *Moringa oleifera* face ao défice hídrico

4. RESPOSTA DA *MORINGA OLEIFERA* FACE AO DÉFICE HÍDRICO

4.1. RESUMO

A *Moringa oleifera* encontra-se distribuída maioritariamente pelos trópicos e subtrópicos. Esta espécie apresenta um elevado valor medicinal e nutricional e o interesse na sua aplicação industrial está diretamente ligado ao seu suposto valor económico. A moringa encontra-se especialmente em zonas sob risco de desertificação (ex.: África, América do Sul), sendo considerada uma fonte nutricional muito rica (apresenta uma combinação de minerais, vitaminas, aminoácidos, compostos fenólicos, proteínas, entre outros) para as populações locais. Contudo, pouco se sabe acerca do comportamento do perfil metabólico desta espécie quando exposto a stresses abióticos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar as alterações metabólicas que ocorrem nas partes aéreas de plantas jovens de moringa expostas a défice hídrico. Um dia e onze dias após a exposição a défice hídrico (DH), recolheram-se as partes aéreas do controlo e de ambos os grupos de tratamento. Após este período as porções aéreas foram imediatamente coletadas e, para cada condição, os metabolitos foram extraídos com hexano (solvente apolar). Antes da injeção no GC-MS, o solvente foi evaporado e o pó resultante de cada amostra foi dissolvido em diclorometano e por fim foi sililado. Ao fim de um dia após o final do stress, os dados cromatográficos obtidos indicam que não houve alterações nas quantidades de ácidos carboxílicos. Contudo, verificaram-se ligeiras descidas de aminoácidos e açúcares e subidas de alcanos, esteróis e álcoois, em relação ao C. Ainda assim, ao fim de onze dias de remoção do stress, as plantas apresentavam novos rebentos o que pode ser explicado pelo aumento e descida de açúcares e alcanos, respetivamente. O stress aplicado pode estar relacionado com o aumento de compostos associados a vias secundárias de defesa (ex. alcanos, álcoois), enquanto que a longo prazo a planta parece apresentar uma recuperação do metabolismo primário (ex.: açúcares, aminoácidos). Embora as plantas de moringa apresentem tolerância ao stress, pois não se verificou mortalidade, o perfil de metabolitos mostrou-se alterado.

4.2. INTRODUÇÃO

As alterações climáticas emergentes apresentam grandes efeitos ao nível da biologia das plantas. Vários estudos citam que as variações abióticas causam efeitos diretos (alteração da fotossíntese e crescimento) e indiretos (aumento das temperaturas médias, chuvas e eventos climáticos extremos) suscetíveis de alterar uma série de aspetos fundamentais do metabolismo das plantas (Ziska e Beggs 2012). As plantas respondem e, por vezes, adaptam-se a stresses

abióticos para conseguir sobreviver em condições ambientais adversas. Ao longo do tempo foram adquirindo mecanismos de tolerância ao stress como mudanças fisiológicas e bioquímicas que resultam em mudanças adaptativas ou morfológicas (Urano et al. 2010).

O perfil de metabolitos tem sido essencial para caracterizar as respostas das plantas aos diferentes stresses abióticos como o défice hídrico, stress salino, temperaturas extremas (frio e calor), radiação ultravioleta, entre outros e decifrar as vias de transdução de sinal que ocorrem neste processo (Urano et al. 2010).

A espécie *M. oleifera* tem sido alvo de grandes estudos em várias áreas de investigação, essencialmente devido às suas inúmeras propriedades medicinais (Anwar et al. 2007, Mahmood et al. 2010, Mishra et al. 2011, Ganatra et al. 2012) e usos industriais (Foidl et al. 2001, Lea 2010, Dubey et al. 2014, Francisco et al. 2014). No entanto, pouco se sabe acerca do modo como esta espécie reage face às diversidades do meio. Nouman et al. (2012) submeteram plantas de *M. oleifera* a quatro níveis de salinidade e avaliaram o comportamento de vários parâmetros fisiológicos (crescimento, pigmentos fotossintéticos, minerais, conteúdo em compostos fenólicos totais e atividade antioxidante). Estes autores concluíram que esta espécie é tolerante à salinidade moderada pois apresenta um sistema antioxidante que lhe permite ativar enzimas de defesa e equilibrar a homeostase iónica. Petchang (2014) testou o efeito da radiação UVC em culturas de *M. oleifera* através da análise dos conteúdos em flavonoides, compostos fenólicos e compostos antioxidantes e concluiu que a radiação UVC consegue estimular a capacidade antioxidante desta espécie. Rivas et al. (2013) ao induzirem condições de défice hídrico durante a germinação de sementes de *M. oleifera* concluíram que as plântulas apresentavam uma elevada capacidade de tolerância à seca durante os primeiros tempos de vida. Por outro lado, Joshi e Mehta (2010) submeteram plantas de *M. oleifera* à seca e concluíram que o valor nutritivo sofria alterações quando as plantas eram expostas ao stress. Ainda Förster et al. (2015) avaliaram o crescimento e o perfil de metabolitos de *M. oleifera* em condições de défice hídrico e baixa disponibilidade de enxofre e verificaram que havia algumas alterações ao nível do crescimento e conteúdo em glicosinolatos. Apesar do clima indígeno da *M. oleifera* apresentar temperaturas elevadas torna-se interessante testar a sua capacidade de sobrevivência em temperaturas mais baixas. Neste contexto, Muhl et al. (2011) submeteram plantas de *M. oleifera* a baixas temperaturas e concluíram que estas apresentam menor desempenho fisiológico apesar de demonstrarem tendências adaptativas. Ainda assim, estudos acerca do modo como a *M. oleifera* reage em condições de radiação ultravioleta B, seca e à junção de ambos os stresses são ainda muito escassos.

Contudo, o perfil metabólico desta espécie tem sido amplamente estudado não só pelas suas inúmeras propriedades medicinais mas também pelo facto da *M. oleifera* ser uma planta que tem

apresentado vários usos ao nível industrial. Vários compostos têm sido identificados na moringa através de diferentes técnicas de análise. Através da análise fitoquímica vários autores verificaram que as folhas são ricas em proteínas, cálcio, ferro, potássio, vitaminas, β -caroteno, aminoácidos, compostos antioxidantes e bioativos (flavonóides, ácidos fenólicos, glucosinolatos e isotiocianatos, taninos e saponinas) (Bennett et al. 2003, Siddhuraju e Becker 2003, Manguro e Lemmen 2007, Ferreira et al. 2008, Roopalatha e Nair 2013, Ojiako 2014, Leone et al. 2015). Sreelatha e Padma (2009), Mohammed e Manan (2015) e Vyas e Kothari (2015) quantificaram os compostos antioxidantes presentes em sementes de *M. oleifera* e concluíram que devido às elevadas quantidades de compostos fenólicos totais encontrados é provável que sejam eles a chave fundamental para a eliminação de ROS. Alguns autores (Imohiosen et al. 2014, Marrufo et al. 2013) estudaram a capacidade antimicrobiana e o perfil fitoquímico da *M. oleifera* e verificaram a presença de compostos bioativos (alcaloides, taninos, fenóis, flavonoides, glicósidos, saponinas, óleo essencial, taninos hidrolisáveis e proteínas) que apresentaram inibição em algumas bactérias, o que prova o potencial desta planta em tratar doenças infecciosas.

No entanto, vários estudos acerca do efeito das alterações climáticas em outras espécies vegetais têm sido feitos na área da metabolómica com o objetivo de averiguar se e de que maneira episódios extremos do clima afetam os metabolitos secundários das plantas. Assim, em plantas de tomate expostas a défice hídrico verificaram-se alterações nas quantidades de alguns compostos que, apesar das diferenças em relação às plantas em condições normais (controlo), foram vistos como efeitos positivos podendo ajudar no melhoramento da qualidade das culturas sob privação de água (Arbona et al. 2013). Plantas de brócolo expostas a radiação UVB demonstraram ser afetadas após os tratamentos, apresentando alterações das quantidades de alguns metabolitos secundários como resposta defensiva face ao stress (Mewis et al. 2012).

Por serem simples, rápidas, económicas e robustas, várias técnicas cromatográficas (como HPLC e GC/MS) têm sido usadas para avaliar o perfil metabólico de espécies vegetais. Shanker et al. (2007) usaram a técnica de HPLC para identificar glicósidos bioativos em plantas de *M. oleifera*. Estas técnicas de análise permitem identificar vários tipos de compostos dependendo das especificações de cada aparelho. Assim, Sánchez-Machado et al. (2006) identificaram tocoferóis nas folhas, flores e vagens de *M. oleifera*.

Urano et al. (2010) concluíram que os metabolitos não só apresentam um papel fundamental na tolerância ao stress como também agem como moléculas de sinalização.

Alguns autores afirmam ainda que as estações do ano têm uma grande influência na composição química da *M. oleifera* mostrando as várias oscilações dos compostos em função das mudanças agroclimáticas (Iqbal e Bhanger 2006, Melesse et al. 2012).

É importante perceber as respostas das plantas face às alterações do meio para incrementar a produtividade das culturas sob condições desfavoráveis e/ou de stress. As respostas e consequentes adaptações das plantas aos stresses abióticos acontecem através de alterações ao nível molecular, celular, fisiológico e bioquímico. É por isso importante aumentar os conhecimentos ao nível das “ómicas” para compreender o que ocorre ao nível das complexas redes reguladoras de metabolitos e assim entender de que modo estão associadas com a adaptação e tolerância a diferentes stresses abióticos (Urano et al. 2010).

O facto de nos últimos tempos as alterações ao nível ambiental serem cada vez maiores e resultados negativos estarem presentes nas várias áreas da biologia, torna-se importante perceber os efeitos das alterações climáticas emergentes no desempenho das plantas. Neste contexto, plantas jovens de *M. oleifera* foram expostas a défice hídrico (recolhidas 1 e 11 dias após o final do stress) e o perfil metabólico foi realizado através de GC-MS. O estudo dos metabolitos foi determinado pelos cromatogramas obtidos através de análises qualitativas e quantitativas.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. CONDIÇÕES DE CULTURA E EXPOSIÇÃO AO STRESS

A) CONDIÇÕES DE CULTURA

Sementes de *M. oleifera* cedidas pelo Ministério da Educação de Timor-Leste foram desinfetadas com NaOCl (10%), lavadas e germinadas em vasos de plástico de 500 ml com uma mistura de turfa e perlite (2:1). Os vasos foram mantidos numa estufa com uma intensidade luminosa de aproximadamente $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, humidade relativa de 40%, uma temperatura de 20 ± 3 °C e um fotoperíodo de 16/8 (dia/noite) durante 2 meses. As plantas foram regadas em dias alternados. Quando as plantas germinaram começaram a ser suplementadas com fertilizante líquido universal (Geolia®, 4-4-4). Após estas atingirem alturas médias de aproximadamente 36 ± 5 cm foram colocadas numa sala de crescimento com as mesmas condições.

B) EXPOSIÇÃO AO DÉFICE HÍDRICO

As plantas de *M. Oleifera* com cerca de 60 dias foram divididas em três grupos, um grupo de controlo (C), um grupo exposto a défice hídrico (DH (1)) que foi recolhido para análise um dia após o final da exposição e um grupo exposto a défice hídrico (DH (11)) que foi recolhido onze dias após o final da exposição. Antes de iniciar os tratamentos todas as plantas foram regadas até à capacidade de campo. As plantas de C foram mantidas nas condições de crescimento e à capacidade de campo durante todo o ensaio. Os outros dois grupos de plantas expostas a DH

ficaram sem rega durante 4 dias. O perfil metabólico das plantas foi analisado em GC-MS, um e onze dias após o final dos tratamentos.

Para a análise do perfil metabólico, recolheu-se a parte aérea das plantas e colocou-se numa estufa de secagem (80°C) durante uma semana. Após esse período as plantas foram colocadas num moinho e reduzidas a pó para posterior extração dos metabolitos.

4.3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Após a secagem em estufa, a porção aérea (caule e folhas) de cada grupo de plantas (C, DH (1) e DH (11)) foi triturado num moinho, tendo-se obtido a quantidade indicada na Tabela 1. Dos diferentes grupos de moringa extraíram-se, com hexano e em sistema fechado (protegido da luz e com agitação constante) os metabolitos da moringa. Esta extração foi feita à temperatura ambiente e em 4 ciclos de 24h (em cada ciclo foram usados 200ml, num total de 800ml de solvente). Os extratos assim obtidos foram filtrados em algodão e o solvente evaporado num evaporador rotativo. Os resíduos, depois de bem secos, foram pesados, tendo-se obtido as massas de extrato indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade de pó obtido da parte aérea de moringa após secagem, quantidade de extrato obtido após evaporação do solvente e quantidade de extrato usado na sililação, para cada grupo de tratamento.

	Quantidade de pó da parte aérea (g)	Quantidade de extrato obtido (g)	Quantidade de extrato usado (mg)
C	3.023	1.215	21.5
DH	2.895	1.346	21.8
DH (11)	5.324	2.591	20.5

4.3.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR GC/MS

Antes da análise por GC, as amostras foram derivatizadas por sililação. Pesaram-se aproximadamente 20mg de cada extrato para tubos de sililação (Tabela 1) aos quais foram adicionados 1,5mL de diclorometano, 200 µL de solução de padrão interno (octadecano, 0.1652mg/mL), 250 µL de piridina, 250 µL de BSTFA e 50 µL de TMSCl). A mistura foi aquecida em banho-maria durante 30 minutos, a 70°C.

4.3.4. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

Para efetuar a análise quantitativa dos constituintes das amostras foram selecionados compostos para serem usados como padrões na elaboração das retas de calibração. A seleção

dos padrões mais adequados foi feita pela análise das principais famílias de compostos presentes nas amostras: ácidos carboxílicos (padrão escolhido: ácido palmítico), alcanos (padrão escolhido: tetracosano), álcoois (padrão escolhido: 1-tetradecanol), esteróis (padrão escolhido: colesterol), aminoácidos (padrão escolhido: L-alanina) e açúcares (padrão escolhido: maltose). Para cada um destes padrões foram preparadas soluções-mãe onde o composto foi dissolvido em 10ml de diclorometano, com a exceção do aminoácido e do açúcar que, por não serem solúveis em diclorometano foram pesados (Anexo 11-B).

Tabela 2 – Concentração das soluções-padrão

Padrão	Massa de padrão (mg/10 mL de CH ₂ CL ₂)
Ácido palmítico	1.204
Tetracosano	1.254
1-Tetradecanol	2.207
<i>n</i> -Octadecano (PI)	1.652
Colesterol	1.894

Para evitar erros sistemáticos foi escolhido, para funcionar como padrão interno, o *n*-octadecano, um composto que nas condições de análise apresenta um tempo de retenção diferente dos compostos encontrados na amostra. Assim, foram preparadas soluções com concentrações conhecidas de cada um destes padrões (Tabela 2) que possibilitaram a obtenção de retas de calibração que relacionam a quantidade de composto (mg) com a razão entre a área do composto e a área do padrão interno. As soluções referidas foram usadas para preparar quatro padrões de concentrações diferentes e assim obter as respectivas retas de calibração (Anexo 11-A).

4.3.5. ANÁLISE DOS METABOLITOS EM GC/MS

Após sililação e com a ajuda de uma seringa, colocaram-se as amostras em *vials* de 2ml e de seguida foram colocadas no injetor automático do cromatógrafo GC-MS QP2010 Ultra Shimadzu.

Condições cromatográficas:

- Gas de Arrasto: Hélio (1.13ml/min).
- Coluna Capilar: DB5-ms
 - Diâmetro interno: 30m x 0.25mm;
 - Espessura do filme: 0.25µm.
- Programa de temperatura:

Temperatura do injetor: 320°C;

Temperatura inicial: 70°C durante 5 min;

Variação de temperatura: 4°C/min até atingir 250°C;

Temperatura final: 300°C a uma taxa de 2°C/min durante 5min.

- **Modo de injeção:** “Split” numa razão de separação de 1:50.

Condições do espectrómetro de massa:

- **Tipo de ionização:** impacto eletrónico;

- **Temperatura da fonte de ionização:** 200°C.

- **Recolha dos dados:**

- 1 scan/s;

- m/z de 33 a 750.

O tempo total do programa foi de 80 minutos. Para o processamento de dados foi utilizado o software GCsolution. Cada amostra (C, DH1 e DH11) foi feita em triplicado, de forma a aumentar a reprodutibilidade.

A análise cromatográfica foi feita através da análise dos picos dos cromatogramas de cada amostra. Para identificação dos picos recorreu-se à biblioteca de compostos NIST14 Mass Spectral e Wiley Registry™ of Mass Spectral Data.

4.4. RESULTADOS

ASPETO GERAL DAS PLANTAS

As plantas controlo apresentavam-se em boas condições, sem clorose, pontos necróticos, nem abscisão foliar (Figura 43). Um dia após a remoção do stress, verificaram-se algumas alterações no aspeto (coloração e necrose) das plantas (Figura 44). Ao fim de 11 dias após término do stress, as plantas expostas a stress hídrico (DH) apresentavam um aspeto saudável, sem pontos necróticos e sinais de senescência, muito semelhantes ao controlo (Figura 45).



Figura 43 – Aspeto das plantas de controlo



Figura 44 – Aspeto das plantas DH (1 dia após o final da exposição) Figura 45 – Aspeto das plantas DH (11 dias após final da exposição)

Tanto o grupo de plantas em seca recolhidas 1 dia após o final do stress como as recolhidas 11 dias após o final do stress apresentavam formação de novos rebentos, indicando sinais de recuperação (Figura 45).

PERFIL DE METABOLITOS

Através da análise dos cromatogramas obtidos, usando a base de dados do GC-MS, foi possível a identificação da composição lipofílica dos extratos (Tabela 3).

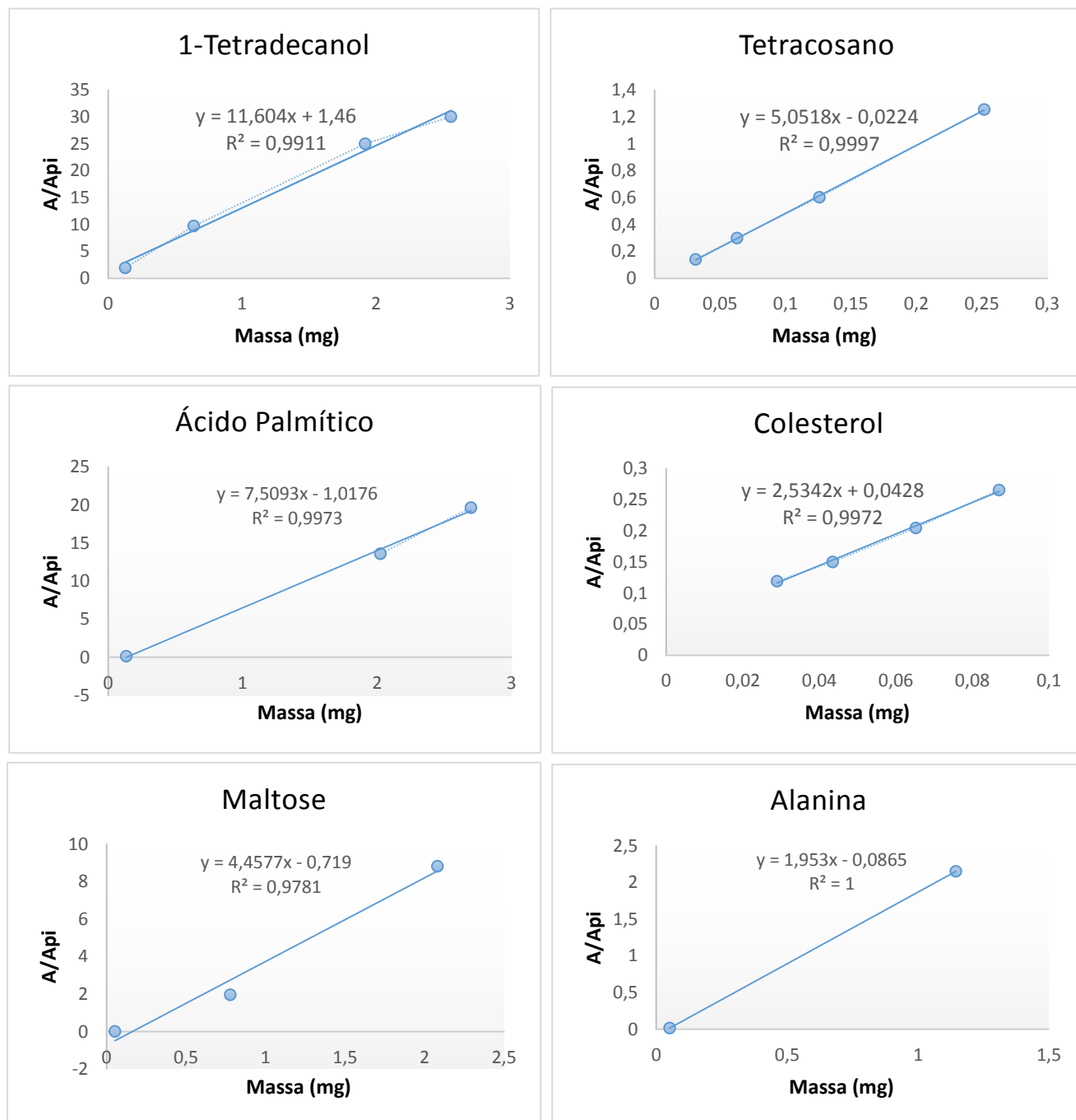


Figura 46 – Retas de calibração obtidas pela relação da área dos picos e área do padrão interno em função da massa de cada composto (1-Tetradecanol para os álcoois, Tetracosano para os alcanos, Ácido palmítico para os ácidos carboxílicos, Colesterol para os esteróis, Maltose para os açúcares e Alanina para os aminoácidos).

A quantificação (Tabela 3) foi efetuada usando as retas de calibração (Figura 46) obtidas para cada um dos padrões escolhidos.

Tabela 3 – Quantidades de compostos após análise em GC-MS, para cada grupo de tratamento (média±desvio-padrão).

Pico*	COMPOSTO	CONTROLO	DH (1)	DH (11)
Açúcares**				
1	D-Frutopirranose	0,346 ± 0,116	0,203 ± 0,019	0,233 ± 0,118
2	D-Talofuranose	0,289 ± 0,033	N.D.	0,19 ± 0,052
3	D-Psicose	0,519 ± 0,444	0,207 ± 0,005	0,359 ± 0,561
4	β-D-Manopirranose	0,377 ± 0,048	0,211 ± 0,021	N.D.
5	β-D-Talopirranose	0,202 ± 0,08	N.D.	N.D.
6	β-D-Xilopirranose	0,231 ± 0,019	N.D.	0,172 ± 0,012
7	β-D-Glucopirranose	0,529 ± 0,025	0,236 ± 0,023	0,491 ± 0,8
8	D-Turanose	0,251 ± 0,13	0,314 ± 0,038	0,227 ± 0,11
9	Sucrose	2,941 ± 0,378	0,652 ± 0,084	1,824 ± 3,119
10	α-D-Alopirranose	N.D.	N.D.	0,178 ± 0,042
11	α-L-Galactofuranose	N.D.	N.D.	0,254 ± 0,304
	Total	5,898	1,823	3,928
Aminoácidos***				
12	L-Valina	0,158 ± 0,013	0,066 ± 0,004	0,056 ± 0,011
13	L-Leucina	0,116 ± 0,005	N.D.	0,048 ± 0,003
14	L-Serina	0,316 ± 0,11	0,081 ± 0,003	0,065 ± 0,024
15	L-Treonina	0,157 ± 0,059	0,074 ± 0,003	0,057 ± 0,011
16	L-5-Oxoprolina	0,356 ± 0,143	0,122 ± 0,022	0,091 ± 0,042
17	Fenilalanina	0,08 ± 0,006	0,077 ± 0,011	N.D.
18	L-Asparagina	N.D.	0,086 ± 0,01	N.D.
19	L-Alanina	N.D.	0,071 ± 0,007	N.D.
20	L-Isoleucina	N.D.	N.D.	0,05 ± 0,008
21	Glicina	N.D.	N.D.	0,049 ± 0,006
	Total	1,635	0,668	0,550
Ácidos carboxílicos****				
22	Ácido Benzenopropanóico	0,277 ± 0,334	N.D.	N.D.
23	Ácido Butanedióico	0,164 ± 0,043	0,143 ± 0,006	0,138 ± 0,008
24	Ácido Glicérico	0,158 ± 0,015	0,141 ± 0,005	0,141 ± 0,022
25	Ácido Undecanóico	0,322 ± 0,657	0,158 ± 0,018	N.D.
26	Ácido Málico	0,921 ± 0,961	0,298 ± 0,047	0,315 ± 0,583
27	Ácido Piroglutâmico	0,258 ± 0,376	N.D.	N.D.
28	Ácido 4-Aminobutanóico	0,277 ± 0,069	0,163 ± 0,018	0,161 ± 0,117
29	Ácido L-Treónico	0,17 ± 0,019	0,141 ± 0,007	0,165 ± 0,113
30	Ácido Etanosulfónico	0,174 ± 0,109	N.D.	N.D.
31	Ácido Cítrico	0,188 ± 0,049	0,15 ± 0,006	0,163 ± 0,07
32	Ácido Quínico	0,347 ± 0,107	0,179 ± 0,012	0,167 ± 0,099
33	Ácido Glucónico	0,158 ± 0,06	N.D.	0,143 ± 0,016
34	Ácido Ribónico	0,405 ± 0,203	N.D.	N.D.
35	Ácido Palmítico	0,636 ± 0,275	0,358 ± 0,171	0,192 ± 0,21
36	Ácido 9,12-Octadecadienóico	0,311 ± 0,162	0,188 ± 0,042	0,146 ± 0,042
37	Ácido α-Linolénico	0,641 ± 0,322	0,27 ± 0,097	0,167 ± 0,118
38	Ácido Esteárico	0,276 ± 0,156	0,194 ± 0,032	0,148 ± 0,038
39	Ácido Octadecanóico	0,284 ± 0,078	0,175 ± 0,04	N.D.
40	Ácido Eicosanóico	N.D.	0,148 ± 0,008	N.D.
41	Ácido L-Aspártico	N.D.	N.D.	0,141 ± 0,025

	Total	5.967	2.706	2.187
Alcanos****				
42	Docosano	0,564 ± 0,075	0,297 ± 0,122	N.D.
43	Alcano 1	0,535 ± 0,123	0,336 ± 0,114	N.D.
44	Tetrapentacontano	0,182 ± 0,086	0,125 ± 0,084	N.D.
45	Alcano 2	0,426 ± 0,049	0,283 ± 0,15	N.D.
46	Alcano 3	0,442 ± 0,132	0,261 ± 0,128	0,018 ± 0,03
47	Alcano 4	0,302 ± 0,04	0,224 ± 0,158	N.D.
48	Alcano 5	N.D.	0,02 ± 0,012	N.D.
59	Alcano 6	N.D.	0,083 ± 0,044	N.D.
50	Alcano 7	N.D.	0,026 ± 0,019	N.D.
51	Alcano 8	N.D.	0,07 ± 0,037	N.D.
52	Alcano 15	N.D.	N.D.	0,013 ± 0,017
	Total	2,451	1,725	0,047
Álcoois****				
53	Glicerol	0,151 ± 0,011	0,1 ± 0,011	0,101 ± 0,122
54	Mio-Inositol	0,306 ± 0,067	0,133 ± 0,047	0,173 ± 0,616
55	α-Tocoferol	0,123 ± 0,062	0,103 ± 0,022	N.D.
56	1-Triacontanol	0,52 ± 0,38	0,22 ± 0,213	0,112 ± 0,067
57	Fitol	N.D.	0,091 ± 0,003	N.D.
58	2-Hexadecen-1-ol	N.D.	0,102 ± 0,025	N.D.
59	1-Octacosanol	N.D.	0,096 ± 0,019	N.D.
60	1,5-Anidroxitol	N.D.	N.D.	0,096 ± 0,168
61	Álcool 1	N.D.	N.D.	0,128 ± 0,193
	Total	1.529	1.003	0.743
Esteróis****				
62	Colest-5-en-3-ol	N.D.	0,081 ± 0,012	N.D.
	Total	0	0.081	0

N.D. – Não detetado | * - Picos dos compostos identificados no respetivo cromatogramas (Anexo 12) | ** - Quantidades de açúcares apresentadas em mg/ 2.25 mL | *** - Quantidades de aminoácidos apresentadas em mg/ 2.25 mL | **** - Quantidades de álcoois, ácidos carboxílicos, alcanos e esteróis apresentadas em mg/3.2 mL

De forma a facilitar a análise de dados foi feita a soma dos compostos pertencentes a cada família e com esses valores construíram-se gráficos que indicam, em percentagem, as quantidades encontradas para o controlo, DH(1) e DH (11) (Figuras 47 e 48).

A porção aérea de moringa em condições controlo apresentou os seguintes compostos: ácidos carboxílicos (34%), açúcares (34%), alcanos (14%), álcoois (9%), aminoácidos (9%) e esteróis (abaixo do limite de deteção) (Figura 47).

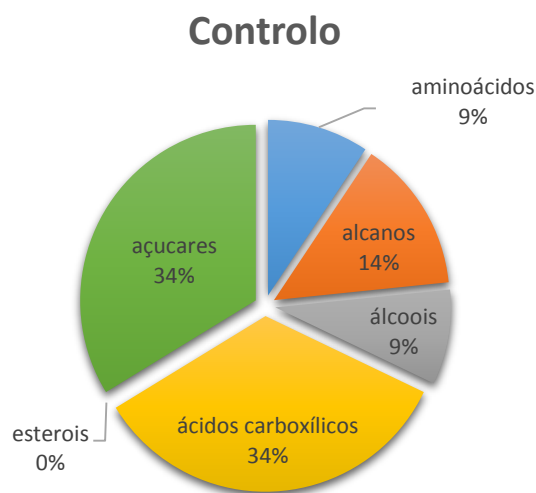


Figura 47 - Perfis de grandes grupos de compostos em porções aéreas de *Moringa oleifera* em condições de controlo

Em condições de seca, um dia após o final da exposição a parte aérea da *M. oleifera* apresentou valores inferiores de açúcares (23%) e aminoácidos (8%), os ácidos carboxílicos mantiveram (34%), os alcanos subiram (22%) assim como os álcoois (12%), os esteróis (1%) e aminoácidos (8%) em relação ao controlo (Figura 48a).

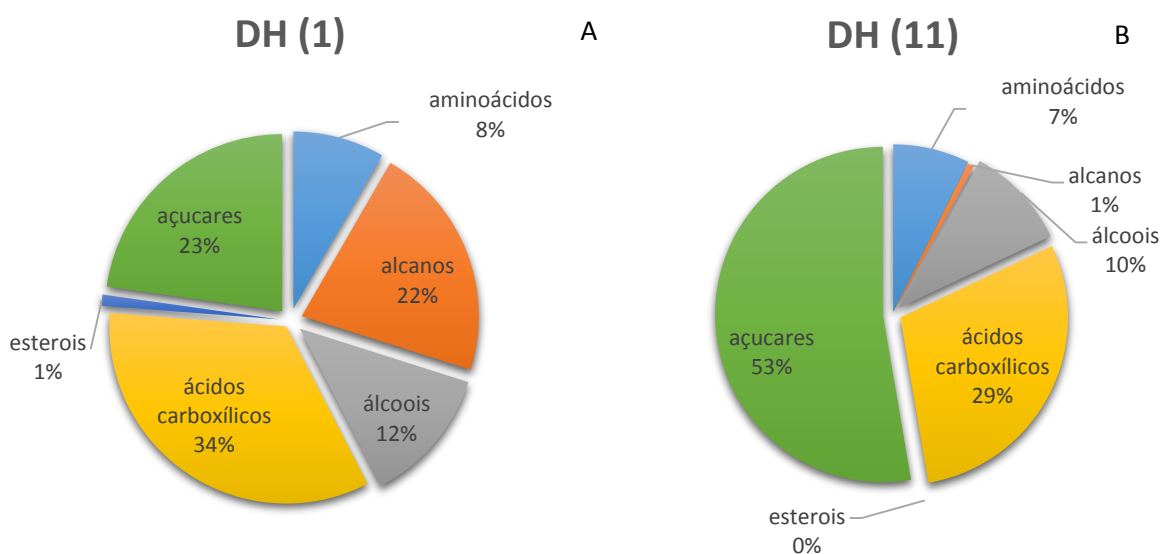


Figura 48a e 48b - Perfis de grandes grupos de compostos em porções aéreas de *Moringa oleifera* exposta a diferentes condições ambientais: a) Déficit Hídrico 1 dia após o final da exposição (DH (1)) e b) Déficit Hídrico 11 dias após o final da exposição (DH (11)).

No final do ensaio, onze dias após a remoção do stress, nas plantas expostas a déficit hídrico verificou-se um aumento de açúcares (53%) e de álcoois (10%), os esteróis não se alteraram (mantiveram-se abaixo do limite de detecção), e verificou-se uma diminuição de ácidos carboxílicos (29%), aminoácidos (7%) e de alcanos (1%) (Figura 48b).

4.5. DISCUSSÃO

Desde tempos remotos que a *Moringa* é considerada uma “super-planta” com elevado potencial na medicina tradicional e nos usos alimentares. Contudo, foi reportado que as alterações climáticas (ex.: seca, aumento de temperatura, aumento dos níveis de radiação UVB, salinidade) podem afetar a performance fisiológica e o perfil de metabolitos de várias espécies florestais tal como é o caso do eucalipto (Correia et al. 2014), do ulmeiro (Dias et al. 2014b), pinheiro (Laakso et al. 2000), videira (Cramer et al. 2007) e *Arabidopsis* (Rizhsky et al. 2004; Urano et al. 2009). Também neste estudo, a exposição de plantas jovens de *Moringa* a déficit hídrico induziu alterações no perfil metabólico.

Neste trabalho todos os compostos químicos encontrados foram divididos por famílias onde foram detetados ácidos carboxílicos, álcoois, alcanos, açúcares, aminoácidos e esteróis.

O perfil de metabolitos de *Moringa* já foi reportado por Mahmud et al. (2014) contudo foi realizado através de RMN e apenas em plantas a crescer em condições ótimas, sem qualquer tipo de stress. Foram identificados por estes autores vários fitocompostos como flavonoides, compostos antioxidantes, vitaminas, minerais e carotenos, assim como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos. Estes autores realçam ainda que diferentes picos e intensidades podem variar consoante o tecido, o que seria espectável face às diferentes funções dos tecidos das folhas e caules, que naturalmente os tornam mais ou menos ricos em compostos fotoassimilados, por exemplo. Os autores referiram cerca de 8 metabolitos (4-aminobutirato, adenosina, guanosina, tirosina e p-cresol) encontrados apenas nas folhas, enquanto o glutamato, glutamina, e triptofano abundavam no caule. Contudo, os autores não reportaram a presença de alcanos, esteróis e álcoois, tal como foram encontrados neste estudo na parte aérea de *Moringa*.

Sabe-se que as funções dos açúcares são de conferir energia e estrutura à planta. Assim, ao realizar fotossíntese a planta produz açúcares que vai usar como combustíveis na respiração celular promovendo o seu crescimento, na seiva orgânica (floema) levando-os para todas as partes da planta e acumula alguns açúcares em órgãos de reserva, sob a forma de amido. As plantas em déficit hídrico, um dia após a remoção do stress (DH1), apresentaram uma redução nas quantidades de açúcares. Num estudo similar realizado com a mesma espécie, Araújo et al. (2015) verificaram uma redução da taxa fotossintética e do crescimento da planta, em condições

de déficit hídrico. Assim, esta redução geral dos níveis de açúcares poderá estar relacionada com uma descida da taxa fotossintética e com a utilização destes metabolitos na respiração e na manutenção celular. Estes dados estão de acordo com o citado por Rolland et al. (2002) onde referem que as variações no ambiente podem diminuir a eficiência fotossintética e resultar em condições limitadas de açúcar em diferentes partes da planta, regulando negativamente a atividade biossintética para conservar energia e proteger as células contra o stress de nutrientes. Contudo, onze dias após o final do stress (DH11) verificou-se uma subida dos níveis de açúcares em relação ao controlo. Os dados de Araújo et al. (2015) mostram também que 11 dias após a remoção do déficit hídrico a fotossíntese aumentou mas continuou com valores inferiores ao controlo. Estes dados poderão indicar que o aumento da concentração de açúcares está relacionado com a recuperação da taxa fotossintética e o aumento de crescimento (Araújo et al. 2015) e também que a planta tem capacidade de recuperar após imposição do stress. Vários trabalhos (Mohammadkhani e Heidari 2008, Rosa et al. 2009, Nazarli e Faraji 2011, Arabzadeh 2012) registaram um aumento da concentração de açúcares solúveis em plantas expostas a stress hídrico. Essa acumulação de açúcares solúveis confere maior tolerância à desidratação contribuindo para a manutenção da turgescência celular (Barrote 2005). A acumulação da sacarose parece contribuir para a manutenção da integridade das membranas celulares, da estrutura das proteínas e da atividade enzimática em tecidos desidratados (Hoekstra et al. 2001).

Os aminoácidos atuam diretamente no metabolismo da planta contribuindo para o seu desenvolvimento, para a produção de moléculas sinalizadoras, entre outros. Sabe-se que as plantas têm a capacidade de sintetizar todos os aminoácidos de que precisam pelo que alterações nas concentrações destes compostos podem indicar algum tipo de stress biótico ou abiótico. Os aminoácidos podem apresentar várias funções na planta, entre elas a capacidade de atuar como agente quelante, serem precursores de fitohormonas e atuarem na regulação do balanço hídrico quando a planta se encontra em déficit hídrico. Em situações de stress, pelos aminoácidos terem uma função de “regeneração” da planta, espera-se que haja um aumento destes compostos. Por exemplo, a fenilalanina é precursora da síntese de compostos bioativos que aumentam a resistência das plantas ao ataque de pragas e doenças (Kim e Hwang 2014). A prolina é outro aminoácido que apresenta um papel importante em situações de déficit hídrico (Krasensky e Jonak 2012). Este aminoácido tem um papel muito importante como osmólito e também atua diretamente eliminando as espécies reativas de oxigénio (Dias et al 2014c). Neste trabalho, de um modo geral, não foram observadas variações significativas das quantidades de aminoácidos nas plantas após a aplicação do déficit hídrico. Isto pode dever-se ao facto da intensidade de stress não ter sido suficiente para provocar danos na planta. Lechinoski et al. (2007) descreveram um aumento da quantidade de aminoácidos em plantas de *Tectona grandis* expostas a déficit

hídrico. Estes autores concluíram que esse aumento poderia estar relacionado com o aumento da atividade de enzimas proteases que, com o aumento da intensidade de stress vão quebrar as proteínas de reserva, aumentando deste modo o teor de aminoácidos solúveis totais. Esse aumento de aminoácidos vai contribuir para o ajuste osmótico.

Os ácidos carboxílicos (ex.: ácidos gordos), álcoois e alcanos são os principais constituintes químicos das ceras cuticulares das folhas (Lee e Suh 2013, Araújo e Silva et al. 2014). As ceras cuticulares tem um papel muito importante na planta, nomeadamente na proteção da desidratação, controlo da radiação e temperatura, transporte de substâncias, proteção contra danos mecânicos e patogénicos (Koch et al 2009). Num trabalho sobre *Coffea arabica*, Affonso (2002) verificou que esta espécie apresenta cera foliar epicuticular com elevado teor de alcanos e, segundo Juniper e Jeffree (1983), os alcanos juntamente com os álcoois primários aumentam o poder impermeabilizante das folhas, protegendo as plantas contra agressões do meio (*vide* Lichston e Godoy 2006). Neste estudo, observou-se um aumento da concentração de alcanos e álcoois 1 dia após o stress, mas após 11 dias tanto os alcanos como os ácidos carboxílicos diminuíram. O aumento destes compostos após o stress pode representar uma tentativa de redução da desidratação. De facto estes dados corroboram com o reportado por Araújo et al. (2015) em que plantas de *M. oleifera* expostas a condições semelhantes não sofreram alterações no teor relativo em água. Um estudo em pinheiro realizado por Le Provost et al. (2013) demonstrou que o conteúdo em cera cuticular observado em condições de stress hídrico foi superior ao encontrado nas plantas de controlo o que sugere que a cera cuticular pode estar envolvida na adaptação da planta ao défice hídrico. Araújo e Silva et al. (2014) observaram o conteúdo em ceras de *Ricinus communis* submetidas a stress hídrico e concluíram que a alteração das quantidades e conteúdo em ceras poderá estar associado com a redução da permeabilidade cuticular e pode ser importante para a aclimação das plantas às condições de limitação de água. Um aumento nos principais compostos das ceras cuticulares (alcanos, ácidos carboxílicos e álcoois) poderá indicar que a planta ativou vias secundárias de defesa em resposta à deficiência de água, como por exemplo reforçando o conteúdo em ceras. Mais uma vez parece haver uma recuperação metabólica, acompanhada pelas observações de formação de novos rebentos nestas plantas, sugerindo uma capacidade de tolerância ao stress hídrico.

Os esteróis são também componentes das membranas. As células vegetais sintetizam uma combinação de esteróis em que o sitosterol, stigmasterol e o 24-methylcholesterol são os compostos predominantes. O sitosterol e o 24-methylcholesterol tem um papel importante na regulação da fluidez e permeabilidade das membranas celulares. Os esteróis nas plantas podem também estar envolvidos na modulação da atividade de algumas enzimas relacionadas com a membrana. O stigmasterol parece também ser necessário para a proliferação celular (Hartmann

1998). As quantidades de esteróis encontradas nas amostras de *M. oleifera* foram muito pequenas, e apenas foi encontrado o Colest-5-en-3-ol. No entanto, sabe-se que em situação de stress os esteróis tendem a aumentar de forma a proteger a permeabilidade das membranas.

4.6. CONCLUSÃO GERAL

Os riscos associados a alterações climáticas são suficientemente elevados para provocar danos nos ecossistemas, nomeadamente nos seres vivos. Muitos estudos têm incidido no impacto em animais, estando ainda pouco discutido o tipo de interferência e o nível de risco que poderão ter nas plantas. Neste trabalho estudou-se o efeito do stress hídrico (um dos maiores riscos associados a alterações climáticas) no perfil metabólico de moringa.

O perfil de metabolitos encontrado na porção aérea de plantas controlo assemelha-se aos grupos de compostos identificados por outros autores para esta espécie, tendo no entanto identificado ainda grupos cujo nível de deteção variava com o tipo de stress aplicado. Por outro lado, verificou-se que em condições de stress (DH(1) e DH(11)), as quantidades de compostos associados a vias secundárias de defesa (como os alcanos, álcoois, ácidos carboxílicos, esteróis, aminoácidos e açúcares) sofreram algumas variações. De uma forma geral, verificou-se que 11 dias após a remoção do stress as plantas mostraram maiores variações do perfil de metabolitos. Apesar do aumento de alguns compostos como alcanos e álcoois terem demonstrado afetar a planta, tanto 1 dia como 11 dias após a remoção do stress, as plantas apresentaram a formação de novos rebentos. Embora o perfil de metabolitos das plantas recolhidas 11 dias após a remoção do stress tenha sido diferente do controlo, parece haver uma recuperação do metabolismo como forma de proteção da planta.

As alterações observadas mostram como, apesar de não induzir mortalidade, a exposição a stress hídrico afetou o metabolismo desta espécie sobretudo ao nível de metabolismo secundário, frequentemente associado de metabolismo primário, sugerindo que esta espécie, até pela sua larga distribuição em zonas de risco de aridez, desenvolverá sob stress hídrico alterações no metabolismo que a ajudam a adaptar-se a esta situação de stress. Por outro lado, as análises temporais, mostram que estas alterações surgem logo aquando da imposição do stress, e ao longo do tempo tende a haver uma adaptação funcional desta espécie que permanece (pelo menos durante alguns dias) após retirada do stress. Por outro lado, embora mais estudos fisiológicos [sobretudo relacionados com o metabolismo de açúcares/carbóno (como fotossíntese e respiração) e com metabolismo secundário] devam ser feitos para acompanhar estes dados metabólicos, pode-se concluir que estas plantas apresentam alguma

capacidade de adaptação (e tolerância) a este stress, envolvendo na adaptação mecanismos de alteração metabólica.

Atualmente, são visíveis os efeitos das alterações climáticas na biosfera e, caso o Homem não atue no sentido de as travar e/ou minimizar, poderão piorar nos próximos tempos. Neste trabalho é perceptível que as alterações climáticas emergentes têm sido alvo de grandes estudos científicos permitindo entender de que forma o mundo vegetal reage a estas adversidades. O objetivo deste trabalho foi simular situações de défice hídrico e de aumento de radiação UVB e entender as alterações fisiológicas e metabólicas que ocorrem em plantas de *M. oleifera* e *E. globulus*. A técnica de GC-MS demonstrou ser eficaz na identificação dos principais compostos orgânicos voláteis nas folhas de *E. globulus* e na parte aérea (folha e caule) de *M. oleifera*. Também se verificou que ambas as exposições (radiação UVB e défice hídrico) não levaram à morte das plantas, contudo foram visíveis algumas alterações morfológicas como clorose e necrose. As análises temporais (um e onze dias após o final do stress), mostraram que as alterações surgem logo aquando da imposição do stress, e ao longo do tempo tende a haver uma adaptação funcional destas espécies. Embora mais estudos nesta área devam ser feitos, pode-se concluir que estas plantas apresentam alguma capacidade de adaptação (e tolerância) aos stresses aplicados.

Para avaliar se em ambos os casos estudados (moringa e eucalipto) existe realmente um período de recuperação por parte das plantas seria interessante alargar o tempo do final do stress para 30 dias e verificar se os valores acompanham os valores de controlo. Simular a exposição das plantas a diferentes quantidades de radiação UVB e défice hídrico, assim como testar o seu desempenho face a outro tipo de stresses abióticos permitiria avaliar o comportamento e a capacidade de adaptação de ambas as espécies.

A hipótese da inibição da via do GPP face à radiação UVB, lançada neste trabalho, deveria ser aprofundada e mais estudos deverão ser feitos para verificar a veracidade da hipótese, assim como identificar o local onde acontece a inibição. Ainda assim, e de forma a completar este estudo, seria interessante alargar a potencialidade do GC/MS e avaliar o que acontece noutro tipo de compostos relevantes na bibliografia, como é o caso dos compostos fenólicos.

As alterações metabólicas induzidas pela exposição a UVB e défice hídrico podem ser vantajosas ao nível industrial, pois estimulam a produção de alguns compostos com grande aplicação farmacêutica e/ou alimentar. Por exemplo através do cultivo de plantas em estufas com condições controladas, poder-se-á manipular a sua composição química e aumentar a produção de compostos orgânicos com elevado interesse comercial.

- Affonso, P. (2002). Comportamento forrageiro de *Atta sexdens* L. em relação a folhas de *Coffea* L. e alguns de seus constituintes químicos (Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo).
- Agati, G. e Tattini, M. (2010). Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186(4), 786-793.
- Aho, I. M. e Lagasi, J. E. (2012). A new water treatment system using *Moringa oleifera* seed. *American Journal of Scientific and Industrial Research*, 3(6), 487-492.
- Akula, R. e Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., e Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., e Gilani, A. H. (2007). *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy Research*, 21(1), 17-25.
- Arabzadeh, N. (2012). The effect of drought stress on soluble carbohydrates (sugars) in two species of haloxylon persicum and haloxylon aphyllum. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11(1), 44-51.
- Araújo, M., Santos, C., Costa, M., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., e Dias, M. C. (2015). Plasticity of young *Moringa oleifera* L. to face combined and isolated water deficit and UVB radiation challenges. Submetido à revista *Plant Physiology and Biochemistry* (Número de submissão: 15-01307)
- Araújo e Silva, M. M., Camara, T. R., e de Oliveira, A. F. M. (2014). Teor e composição química de ceras cuticulares foliares em mamoneira exposta à deficiência hídrica. In VI Congresso Brasileiro de Mamona e III Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas-Fortaleza 2014.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C. D., e Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4885-4911.
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*, 28(1), 169-183.
- Avnery, S., Mauzerall, D. L., Liu, J., e Horowitz, L. W. (2011). Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O₃ pollution. *Atmospheric Environment*, 45(13), 2297-2309.
- Azevedo, D. (2004). Espectrometria de Massas, Fevereiro 2004. LABEM – Laboratório de Espectrometria de Massas do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Bais, A. F., Lubin, D., Arola, A., Bernhard, G., Blumthaler, M., Chubarova, N., ... e United Nations Environment Programme d'Ozone Secretariat. (2006). Surface ultraviolet radiation: past, present, and future. *Scientific Assessment of Ozone Depletion*, 7(21), 1-54.
- Ball, J. B. (1995). Development of *eucalyptus* plantations: an overview. *RAPA Publication* (FAO).
- Ballaré, C. L., Caldwell, M. M., Flint, S. D., Robinson, S. A., e Bornman, J. F. (2011). Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(2), 226-241.

- Barrote, I. (2005). Efeitos *a posteriori* dos défices hídricos sobre a atividade fotossintética: mecanismos de fotoproteção e sistema enzimático antioxidante (Tese de Doutoramento, Universidade do Algarve).
- Bartels, D., e Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23-58.
- Beaumont, L. J., Pitman, A., Perkins, S., Zimmermann, N. E., Yoccoz, N. G., e Thuiller, W. (2011). Impacts of climate change on the world's most exceptional ecoregions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2306-2311.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., e Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*, 15(4), 365-377.
- Bennett, R. N., Mellon, F. A., Foidl, N., Pratt, J. H., Dupont, M. S., Perkins, L., e Kroon, P. A. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3546-3553.
- Bernal, M., Llorens, L., Badosa, J., e Verdaguer, D. (2013). Interactive effects of UV radiation and water availability on seedlings of six woody Mediterranean species. *Physiologia plantarum*, 147(2), 234-247.
- Bhargava, K. M., Singh, A., e Kumar, A. (2014). Seasonal variation in physiology of *Eucalyptus* genotypes in relation to soil salinity. *International Journal*, 2(6), 281-290.
- Bindi, M., e Olesen, J. E. (2011). The responses of agriculture in Europe to climate change. *Regional Environmental Change*, 11(1), 151-158.
- Boeger, M. R. T., e Poulson, M. E. (2006). Efeitos da radiação ultravioleta B sobre a morfologia foliar de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 20(2), 329-338.
- Bornman, J. F., Barnes, P. W., Robinson, S. A., Ballare, C. L., Flint, S. D., e Caldwell, M. M. (2015). Solar ultraviolet radiation and ozone depletion-driven climate change: effects on terrestrial ecosystems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(1), 88-107.
- Boudjabi, S., Kribaa, M., e Chenchouni, H. (2015). Growth, physiology and yield of durum wheat (*Triticum durum*) treated with sewage sludge under water stress conditions. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 14(1), 320-334.
- Buckeridge, M. S., Mortari, L. C., Machado, M. R., Rego, G. M., Negrelle, R. R. B., e Morellato, L. P. C. (2007). Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema. *Fenologia – Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos (REGO) GM 1-13*.
- Caldwell, M. M., Björn, L. O., Bornman, J. F., Flint, S. D., Kulandaivelu, G., Teramura, A. H., e Tevini, M. (1998). Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46(1), 40-52.
- Callaghan, T. V., Bergholm, F., Christensen, T. R., Jonasson, C., Kokfelt, U., e Johansson, M. (2010). A new climate era in the sub-Arctic: Accelerating climate changes and multiple impacts. *Geophysical Research Letters*, 37(14).
- Cameron, R. J. (1970). Light intensity and the growth of *Eucalyptus* seedlings. II. The effect of cuticular waxes on light absorption in leaves of *Eucalyptus* species. *Australian Journal of Botany*, 18(3), 275-284.
- Ceccarelli, S., Grando, S., Maatougui, M., Michael, M., Slash, M., Haghparast, R., ... e Nachit, M. (2010). Plant breeding and climate changes. *The Journal of Agricultural Science*, 148(06), 627-637.

- Change, I. P. O. C. (2007). Climate change 2007: The physical science basis. *Agenda*, 6(07), 333.
- Chehab, E. W., Kaspi, R., Savchenko, T., Rowe, H., Negre-Zakharov, F., Kliebenstein, D., e Dehesh, K. (2008). Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses. *PLoS one*, 3(4), e1904-e1904.
- Chen, H. C., Chi, H. S., e Lin, L. Y. (2013). Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile components in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem. *Molecules*, 18(11), 13723-13734.
- Chiaradia, M. C., Collins, C. H., e Jardim, I. C. S. F. (2008). O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31(3), 623-636.
- Chryssolouris, G., Papakostas, N., e Mavrikios, D. (2008). A perspective on manufacturing strategy: Produce more with less. *CIRP Journal of Manufacturing Science and Technology*, 1(1), 45-52.
- Coe, M. T., Marthews, T. R., Costa, M. H., Galbraith, D. R., Greenglass, N. L., Imbuzeiro, H. M., ... e Wang, J. (2013). Deforestation and climate feedbacks threaten the ecological integrity of south-southeastern Amazonia. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1619), 20120155.
- Cordeiro, Y. E., Pinheiro, H. A., dos Santos Filho, B. G., Corrêa, S. S., e Silva, J. R., e Dias-Filho, M. B. (2009). Physiological and morphological responses of young mahogany (*Swietenia macrophylla* King) plants to drought. *Forest Ecology and Management*, 258(7), 1449-1455.
- Coriani, N. (2009). Relação entre estresse de radiação ultravioleta-B e óxido nítrico em plantas de eucalipto. (Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho).
- Correia, B., Pintó-Marijuan, M., Neves, L., Brossa, R., Dias, M. C., Costa, A., e Pinto, G. (2014). Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum*, 150(4), 580-592.
- Costa e Silva, F., Shvaleva, A., Broetto, F., Ortuño, M. F., Rodrigues, M. L., Almeida, M. H., e Pereira, J. S. (2009). Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. *Tree Physiology*, 29(1), 77-86.
- Cramer, G. R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R. L., Tattersall, E. A., Bohlman, M. C., ... e Cushman, J. C. (2007). Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional & Integrative Genomics*, 7(2), 111-134.
- de Almeida Costa, J., González, J. C., Camargos, J. A. A., e Gomes, I. A. S. (2011). Fotodegradação de duas espécies de madeiras tropicais: jatobá (*Hymenaea courbaril*) e tauari (*Couratari oblongifolia*) submetidas à radiação ultravioleta. *Cerne, Lavras*, 17(1), 133-139.
- de Oliveira, A. B., Gomes-Filho, E., e Alencar, N. L. M. (2013). Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. INTECH Open Access Publisher, 4(1). ISBN: 978-953-51-0933-4.
- da Silva, J. P., Serra, T. M., Gossmann, M., Wolf, C. R., Meneghetti, M. R., e Meneghetti, S. M. (2010). *Moringa oleifera* oil: studies of characterization and biodiesel production. *Biomass and Bioenergy*, 34(10), 1527-1530.
- DaMatta, F. M., Grandis, A., Arenque, B. C., e Buckeridge, M. S. (2010). Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, 43(7), 1814-1823.
- Das, P., Nutan, K. K., Singla-Pareek, S. L., e Pareek, A. (2015). Understanding salinity responses and adopting 'omics-based' approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. *Frontiers in Plant Science*, 6.

- Dias, M. C. (2005). The role of C3 and C4 metabolism for drought tolerance in the genus *Flaveria*. (Tese de Doutorado, Universidade de Frankfurt)
- Dias, M. C., Azevedo, C., Costa, M., Pinto, G., e Santos, C. (2014a). *Melia azedarach* plants show tolerance properties to water shortage treatment: An ecophysiological study. *Plant Physiology and Biochemistry*, 75, 123-127.
- Dias, M. C., Correia, C., Moutinho-Pereira, J., Oliveira, H., e Santos, C. (2014c). Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 117(2), 213-224.
- Dias, M. C., Oliveira, H., Costa, A., e Santos, C. (2014b). Improving elms performance under drought stress: The pretreatment with abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 64-73.
- Dias, M. C., Pinto, G., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J., Silva, S., e Santos, C. (2013). Photosynthetic parameters of *Ulmus minor* plantlets affected by irradiance during acclimatization. *Biologia Plantarum*, 57(1), 33-40.
- Dubey, D. K., Dora, J., Kumar, A., e Gulsan, R. K. (2014). A multipurpose tree - *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 5(2), 102-105.
- Edenhofer, O., Pichs-Madruga, R., Sokona, Y., Seyboth, K., Kadner, S., Zwickel, T., ... e Matschoss, P. (Eds.). (2011). Renewable energy sources and climate change mitigation: Special report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, pp. 6-230. ISBN 978-92-9169-131-9.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L. W., e Rohn, S. (2011). UV-B induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 126(1), 60-64.
- Ellis, E. C. (2011). Anthropogenic transformation of the terrestrial biosphere. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 369(1938), 1010-1035.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties - Part 1. *Trees for Life Journal*, 1(5), 1-15.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., e Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1), 185-212.
- Fedina, I. S., e Velitchkova, M. Y. (2009). Physiological responses of higher plants to UV-B radiation. In *Climate Change and Crops* (pp. 283-305). Springer Berlin Heidelberg.
- Ferreira, P. M. P., Farias, D. F., Oliveira, J. T. D. A., e Carvalho, A. D. F. U. (2008). *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. *Revista de Nutrição*, 21(4), 431-437.
- Foidl, N., Makkar, H. P. S., e Becker, K. (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In *The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa*, 45-76.
- Förster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Arndt, N., Schmidt, R., e Mewis, I. (2015). Ecotype variability in growth and secondary metabolite profile in *Moringa oleifera*: Impact of sulfur and water availability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(11), 2852-2861.
- Francisco, J. P., Silva, J. B., Roque, O. C., Nascentes, A. L., e Silva, L. D. (2014). Evaluation of the effect of the seed extract of *Moringa oleifera* Lam over the efficiency of organic filters in wastewater treatment of dairy cattle breeding. *Engenharia Agrícola*, 34(1), 143-152.
- Ganatra, T. H., Joshi, U. H., Bhalodia, P. N., Desai, T. R., e Tirgar, P. R. (2012). A panoramic view on pharmacognostic, pharmacological, nutritional, therapeutic and prophylactic values of *Moringa oleifera* Lam. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(1), 1-7.

- Ghosh, P., Afre, R. A., Soga, T., e Jimbo, T. (2007). A simple method of producing single-walled carbon nanotubes from a natural precursor: *Eucalyptus* oil. *Materials Letters*, 61(17), 3768-3770.
- Gil, M., Bottini, R., Berli, F., Pontin, M., Silva, M. F., e Piccoli, P. (2013). Volatile organic compounds characterized from grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) berries increase at pre-harvest and in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 96(1), 148-157.
- Gil, M., Pontin, M., Berli, F., Bottini, R., e Piccoli, P. (2012). Metabolism of terpenes in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf tissues to UV-B radiation. *Phytochemistry*, 77(1), 89-98.
- Gilbert, K. G., e Cooke, D. T. (2001). Dyes from plants: past usage, present understanding and potential. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 57-69.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., e Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119(2), 731-737.
- Godino, M., Villegas, S., Izquierdo, M. I., Velásquez, J. C., e Vargas, R. (2013). Evaluación del uso energético de la *Moringa oleifera*. *Revista Agroforestería Neotropical*, 2(1), 48-58.
- Golldack, D., Lüking, I., e Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, 30(8), 1383-1391.
- Goyal, B. R., Agrawal, B. B., Goyal, R. K., e Mehta, A. A. (2007). Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam.: an overview. *Natural Product Radiance*, 6(4), 347-353.
- Hagel, J. M., Krizevski, R., Marsolais, F., Lewinsohn, E., e Facchini, P. J. (2012). Biosynthesis of amphetamine analogs in plants. *Trends in Plant Science*, 17(7), 404-412.
- Hajnos, M. L., Zabel, A. M., e Glowniak, K. (2001). The influence of ultraviolet radiation on the content of pharmacologically active taxoids in yew tissues. *Phytomedicine*, 8(2), 139-143.
- Hanewinkel, M., Cullmann, D. A., Schelhaas, M. J., Nabuurs, G. J., e Zimmermann, N. E. (2013). Climate change may cause severe loss in the economic value of European forest land. *Nature Climate Change*, 3(3), 203-207.
- Hartmann, M. A. (1998). Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science*, 3(5), 170-175.
- Heijde, M., e Ulm, R. (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science*, 17(4), 230-237.
- Hideg, É., Jansen, M. A., e Strid, Å. (2013). UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates?. *Trends in Plant Science*, 18(2), 107-115.
- Hidema, J., Kang, H. S., e Kumagai, T. (1999). Changes in cyclobutyl pyrimidine dimer levels in rice (*Oryza sativa* L.) growing indoors and outdoors with or without supplemental UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52(1), 7-13.
- Hidema, J., e Kumagai, T. (2006). Sensitivity of rice to ultraviolet-B radiation. *Annals of Botany*, 97(6), 933-942.
- Hidema, J., Makino, A., Kurita, Y., Mae, T., e Ojima, K. (1992). Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of PS II in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant and Cell Physiology*, 33(8), 1209-1214.
- Hill, J. K., Griffiths, H. M., e Thomas, C. D. (2011). Climate change and evolutionary adaptations at species range margins. *Annual Review of Entomology*, 56(1), 143-159.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., e Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(9), 431-438.

- Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33(2), 179-197.
- Höök, M., e Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change - A review. *Energy Policy*, 52(1), 797-809.
- Imohiosen, O., Gurama, H. H., e Lamidi, T. B. (2014). Phytochemical and antimicrobial studies on *Moringa oleifera* leaves extracts. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(1) 39-45.
- ICNIRP, International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. (2004). Guidelines on limits of exposure to ultraviolet radiation of wavelengths between 180 nm and 400 nm (incoherent optical radiation). *Health Physics*, 87(2), 171-186.
- IEA, International Energy Agency Staff (Edition 2014). *CO₂ emissions from fuel combustion - Highlights*. OECD
- IPCC, (2007): Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M.Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- IPCC, (2011): IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation. Prepared by Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change [O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, K. Seyboth, P. Matschoss, S. Kadner, T. Zwickel, P. Eickemeier, G. Hansen, S. Schlömer, C. von Stechow (eds)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1075 pp.
- Iqbal, S., e Bhanger, M. I. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 544-551.
- Irigoyen, J. J., Einerich, D. W., e Sánchez-Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 55-60.
- Isca, V. M., Seca, A. M., Pinto, D. C., Silva, H., e Silva, A. M. (2014). Lipophilic profile of the edible halophyte *Salicornia ramosissima*. *Food Chemistry*, 165(1), 330-336.
- Johnson, C. B., Kirby, J., Naxakis, G., e Pearson, S. (1999). Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 51(4), 507-510.
- Jones, H. G. (2007). Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), 119-130.
- Joshi, P., e Mehta, D. (2010). Effect of dehydration on the nutritive value of drumstick leaves. *Journal of Metabolomics and Systems Biology*, 1(1), 5-9.
- Juniper, B. E., e Jeffree, C. E. (1983). *Plant Surfaces*, 93. Edward Arnold. ISBN 0713128569.
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Zhao, D., e Mohammed, A. R. (2003). Effects of ultraviolet-B radiation on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) morphology and anatomy. *Annals of Botany*, 91(7), 817-826.
- Kakani, V. G., Reddy, K. R., Zhao, D., e Sailaja, K. (2003). Field crop responses to ultraviolet-B radiation: a review. *Agricultural and Forest Meteorology*, 120(1), 191-218.
- Kasolo, J. N., Bimenya, G. S., Ojok, L., Ochieng, J., e Ogwal-Okeng, J. W. (2010). Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Ugandan rural communities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(9), 753-757.

- Kim, D. S., e Hwang, B. K. (2014). An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, eru109.
- Kim, S., Lowman, S., Hou, G., Nowak, J., Flinn, B., e Mei, C. (2012). Growth promotion and colonization of switchgrass (*Panicum virgatum* cv. Alamo) by bacterial endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Biotechnology Biofuels*, 5(37), 1-10.
- Koch, K., Bhushan, B., e Barthlott, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science*, 54(2), 137-178.
- Krasensky, J., e Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593-1608.
- Külheim, C., Padovan, A., Hefer, C., Krause, S. T., Köllner, T. G., Myburg, A. A., ... e Foley, W. J. (2015). The *Eucalyptus* terpene synthase gene family. *BMC Genomics*, 16(1), 450.
- Kwon, T. Y., Park, J. S., e Jung, M. Y. (2013). Headspace–Solid Phase Microextraction - Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS²) method for the determination of pyrazines in Perilla seed oils: impact of roasting on the pyrazines in Perilla seed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(36), 8514-8523.
- Laakso, K., Sullivan, J. H., e Huttunen, S. (2000). The effects of UV-B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant, Cell & Environment*, 23(5), 461-472.
- Lal, R. (2010). Managing soils and ecosystems for mitigating anthropogenic carbon emissions and advancing global food security. *BioScience*, 60(9), 708-721.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P. B., e Lange, M. (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6866-6871.
- Lawrence, D., e Vandecar, K. (2015). Effects of tropical deforestation on climate and agriculture. *Nature Climate Change*, 5(1), 27-36.
- Le Provost, G., Domergue, F., Lalanne, C., Campos, P. R., Grosbois, A., Bert, D., ... e Gion, J. M. (2013). Soil water stress affects both cuticular wax content and cuticle-related gene expression in young saplings of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). *BMC Plant Biology*, 13(1), 95.
- Lea, M. (2010). Bioremediation of turbid surface water using seed extract from *Moringa oleifera* Lam. (drumstick) tree. *Current Protocols in Microbiology*, 1G-2.
- Lechinoski, A., Freitas, J. M. N., Castro, D. S., Lobato, A. K. S., Oliveira Neto, C. F., e Cunha, R. L. M. (2007). Influence of water stress on levels of soluble amino acids and proteins in leaves of teak (*Tectona grandis* L. f.). *Revista Brasileira de Biociência*, 5(1), 927-929.
- Lee, G. W., Lee, S., Chung, M. S., Jeong, Y. S., e Chung, B. Y. (2014). Rice terpene synthase 20 (OsTPS20) plays an important role in producing terpene volatiles in response to abiotic stresses. *Protoplasma*, 1-11.
- Lee, S. B., e Suh, M. C. (2013). Recent advances in cuticular wax biosynthesis and its regulation in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 6(2), 246-249.
- Leone, A., Fiorillo, G., Criscuoli, F., Ravasenghi, S., Santagostini, L., Fico, G., e Bertoli, S. (2015). Nutritional characterization and phenolic profiling of *Moringa oleifera* leaves grown in Chad, Sahrawi refugee camps, and Haiti. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18923-18937.
- Liakoura, V., Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., Karabourniotis, G., e Manetas, Y. (1999). Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. *Tree Physiology*, 19(13), 905-908.

- Lichston, J. E., e Godoy, S. A. P. D. (2006). Morphology and epicuticular wax content of coffee leaves after fungicide application. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(6), 919-926.
- Lidon, F. C., e Ramalho, J. C. (2011). Impact of UV-B irradiation on photosynthetic performance and chloroplast membrane components in *Oryza sativa* L. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104(3), 457-466.
- Liu, D., Gao, Y., Li, X. X., Li, Z., e Pan, Q. H. (2015). Attenuated UV radiation alters volatile profile in cabernet sauvignon grapes under field conditions. *Molecules*, 20(9), 16946-16969.
- Liu, L. X., Xu, S. M., e Woo, K. C. (2005). Solar UV-B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophyll cycle in tropical acacias and *eucalyptus*. *Environmental and Experimental Botany*, 54(2), 121-130.
- Llusia, J., Llorens, L., Bernal, M., Verdager, D., e Peñuelas, J. (2012). Effects of UV radiation and water limitation on the volatile terpene emission rates, photosynthesis rates, and stomatal conductance in four Mediterranean species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2), 757-769.
- Madronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O., e Caldwell, M. M. (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 46(1), 5-19.
- Mahmood, K. T., Mugal, T., e Haq, I. U. (2010). *Moringa oleifera*: A natural gift - A review. *Journal Pharmacy Science Research*, 2(1), 775-781.
- Mahmud, I., Chowdhury, K., e Boroujerdi, A. (2014). Tissue-specific metabolic profile study of *Moringa oleifera* L. using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 24(1), 77-86.
- MAMAOT, (2013). Relatório de Estratégia de adaptação da agricultura e das florestas às alterações climáticas, Abril 2013. Ministério da Agricultura, do Mar, Ambiente e Ordenamento do Território, Portugal Continental.
- Manguro, L. O. A., e Lemmen, P. (2007). Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. *Natural Product Research*, 21(1), 56-68.
- Marrufo, T., Encarnação, S., Silva, O. M. D., Duarte, A., Fazenda Neto, F., Barbosa, F. M., e Agostinho, A. B. (2013). Chemical characterization and determination of antioxidant and antimicrobial activities of the leaves of *Moringa oleifera*. *Revista Internacional de Gestão de Conflitos Ambientais*, 2(1), 1-15.
- Martos, I., Ferreres, F., Yao, L., D'Arcy, B., Caffin, N., e Tomás-Barberán, F. A. (2000). Flavonoids in monospecific *Eucalyptus* honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4744-4748.
- Maxwell, K., e Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- McKiernan, A. B., Hovenden, M. J., Brodribb, T. J., Potts, B. M., Davies, N. W., e O'Reilly-Wapstra, J. M. (2014). Effect of limited water availability on foliar plant secondary metabolites of two *Eucalyptus* species. *Environmental and Experimental Botany*, 105(1), 55-64.
- Melesse, A., Steingass, H., Boguhn, J., Schollenberger, M., e Rodehutsord, M. (2012). Effects of elevation and season on nutrient composition of leaves and green pods of *Moringa stenopetala* and *Moringa oleifera*. *Agroforestry Systems*, 86(3), 505-518.
- Mewis, I., Schreiner, M., Nguyen, C. N., Krumbein, A., Ulrichs, C., Lohse, M., e Zrenner, R. (2012). UV-B irradiation changes specifically the secondary metabolite profile in broccoli sprouts: induced signaling overlaps with defense response to biotic stressors. *Plant and Cell Physiology*, 53(9), 1546-1560.

- Mishra, G., Singh, P., Verma, R., Kumar, S., Srivastav, S., Jha, K. K., e Khosa, R. L. (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of *Moringa oleifera* plant: An overview. *Der Pharmacia Lettre*, 3(2), 141-164.
- Mohammadkhani, N., e Heidari, R. (2008). Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal*, 3(3), 448-453.
- Mohammed, S., e Manan, F. A. (2015). Analysis of total phenolics, tannins and flavonoids from *Moringa oleifera* seed extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 132-135.
- Monteiro, C., Santos, C., Pinho, S., Oliveira, H., Pedrosa, T., e Dias, M. C. (2012). Cadmium-induced cyto and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chemical Research in Toxicology*, 25(7), 1423-1434.
- Moreira, N., Meireles, S., Brandão, T., e de Pinho, P. G. (2013). Optimization of the HS-SPME–GC–IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. *Talanta*, 117(1), 523-531.
- Moura, A., Souza, A., Junior, A., Lira, M., e Silva, G. (2009). Caracterização Físico-química da folha, flor e vagem da Moringa (*Moringa oleifera* Lamarck). *I Encontro Nacional de Moringa, Aracajú*.
- Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., e Muchenje, V. (2013). Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925-12933.
- Mpelasoka, F., Hennessy, K., Jones, R., e Bates, B. (2008). Comparison of suitable drought indices for climate change impacts assessment over Australia towards resource management. *International Journal of Climatology*, 28(10), 1283-1292.
- Muhl, Q. E., Du Toit, E. S., e Robbertse, P. J. (2011). *Moringa oleifera* (Horseradish tree) leaf adaptation to temperature regimes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(1), 1021-1024.
- Munné-Bosch, S., e Alegre, L. (2000). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta*, 210(6), 925-931.
- Nazarli, H., e Faraji, F. (2011). Response of proline, soluble sugars and antioxidant enzymes in wheat (*Triticum aestivum* L.) to different irrigation regimes in greenhouse condition. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 44(4), 27-33.
- Nogués, S., Allen, D. J., Morison, J. I., e Baker, N. R. (1999). Characterization of stomatal closure caused by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiology*, 121(2), 489-496.
- Nouman, W., Siddiqui, M. T., Basra, S. M. A., Khan, R. A., Gull, T., Olson, M. E., e Munir, H. (2012). Response of *Moringa oleifera* to saline conditions. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(1), 757-762.
- Obata, T., e Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3225-3243.
- Ogaya, R., e Peñuelas, J. (2003). Comparative field study of *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*: photosynthetic response to experimental drought conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 50(2), 137-148.
- Ojiako, E. N. (2014). Phytochemical analysis and antimicrobial screening of *Moringa oleifera* leaves extract. *The International Journal of Engineering and Science*, 3(3), 32-35.
- Olesen, J. E., e Bindi, M. (2002). Consequences of climate change for european agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy*, 16(4), 239-262.

- Oliveira-Júnior, A. M. D., Silva, T. C. S., Nunes, T. P., Costa, D. G., Lima, L. A. L. C., e Silva, G. F. (2013). Utilização de sementes de *Moringa oleifera* Lam. como alternativa para produção de biodiesel. *GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias*, 3(2), 012-025.
- Omotesho, K. F., Sola-Ojo, F. E., Fayeye, T. R., Babatunde, R. O., Otunola, G. A., e Aliyu, T. H. (2013). The potential of Moringa tree for poverty alleviation and rural development: Review of evidences on usage and efficacy. *International Journal of Development and Sustainability*, 2(2), 799-813.
- Ort, D. R., e Ainsworth, E. (2012). Focus on climate change. *Plant Physiology*, 160(1), 1675-1676.
- Osaki, M., Shinano, T., e Tadano, T. (1991). Redistribution of carbon and nitrogen compounds from the shoot to the harvesting organs during maturation in field crops. *Soil Science and Plant Nutrition*, 37(1), 117-128.
- Paiva, J. (1997). *Eucalyptus* L. in Castroviejo, S., Aedo, C., Laínz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. e Benedí, C. (eds.). *Flora iberica*, 8(1), 77-82. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.
- Palmer-Young, E. C., Veit, D., Gershenzon, J., e Schuman, M. C. (2015). The sesquiterpenes (E)- β -farnesene and (E)- α -bergamotene quench ozone but fail to protect the wild tobacco *Nicotiana attenuata* from ozone, UVB, and drought stresses. *PloS one*, 10(6), e0127296.
- Pancotto, V. A., Sala, O. E., Cabello, M., López, N. I., Matthew Robson, T., Ballaré, C. L., ... e Scopel, A. L. (2003). Solar UV-B decreases decomposition in herbaceous plant litter in Tierra del Fuego, Argentina: potential role of an altered decomposer community. *Global Change Biology*, 9(10), 1465-1474.
- Pandey, P., Ramegowda, V., e Senthil-Kumar, M. (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 6(1), 723.
- Paul, N. D., e Gwynn-Jones, D. (2003). Ecological roles of solar UV radiation: towards an integrated approach. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(1), 48-55.
- Pereira, H. M., Leadley, P. W., Proença, V., Alkemade, R., Scharlemann, J. P., Fernandez-Manjarrés, J. F., ... e Walpole, M. (2010). Scenarios for global biodiversity in the 21st century. *Science*, 330(6010), 1496-1501.
- Petchang, R. (2014). Effect of UV-C irradiation on antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents and quantitative determination of bioactive components of *Moringa oleifera* Lam. shoot culture. *African Journal of Biotechnology*, 13(41), 4093.
- Pidtasang, B., Udomsap, P., Sukkasi, S., Chollacoop, N., e Pattiya, A. (2013). Influence of alcohol addiction on properties of bio-oil produced from fast pyrolysis of *eucalyptus* bark in a free-fall reactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(6), 1851-1857.
- Pinheiro, C., e Chaves, M. M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 869-882.
- Rahmstorf, S., Foster, G., e Cazenave, A. (2012). Comparing climate projections to observations up to 2011. *Environmental Research Letters*, 7(4), 044035.
- Ramachandran, C., Peter, K. V., e Gopalakrishnan, P. K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany*, 34(3), 276-283.
- Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. R., e Knothe, G. (2008). *Moringa oleifera* oil: a possible source of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99(17), 8175-8179.
- Reboredo, F., e Lidon, F. J. (2012). UV-B radiation effects on terrestrial plants - A perspective. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6), 502-509.

- Rivas, R., Oliveira, M. T., e Santos, M. G. (2013). Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63(1), 200-208.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., e Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134(4), 1683-1696.
- Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., e Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science*, 332(6025), 103-106.
- Rocha, S., Ramalheira, V., Barros, A., Delgadillo, I., e Coimbra, M. A. (2001). Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5142-5151.
- Rockwood, D. L., Rudie, A. W., Ralph, S. A., Zhu, J. Y., e Winandy, J. E. (2008). Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8), 1361-1378.
- Rodriguez, E., da Conceição Santos, M., Azevedo, R., Correia, C., Moutinho-Pereira, J., de Oliveira, J. M. P. F., e Dias, M. C. (2015). Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 574-585.
- Rolland, F., Moore, B., e Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14(1), S185-S205.
- Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U., e Stimm, B. (2009). *Moringa oleifera* Lam., 1785. Enzyklopädie der Holzgewächse, Handbuch und Atlas der Dendrologie. *Sea*, 10(10). ISBN: 9783527321414.
- Roopalatha, U. C., e Nair, V. M. G. (2013). Phytochemical analysis of successive re-extracts of the leaves of *Moringa oleifera* lam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 629-634.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., e Prado, F. E. (2009). Soluble sugars: metabolism, sensing and abiotic stress: a complex network in the life of plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(5), 388-393.
- Rout, G. R., e Senapati, S. K. (2013). Stress tolerance in plants: a proteomics approach. In *Molecular Stress Physiology of Plants*, 15(1), 359-386. Springer India.
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L. O., e Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(1), 22-28.
- Ryan, K. G., e Hunt, J. E. (2005). The effects of UVB radiation on temperate southern hemisphere forests. *Environmental Pollution*, 137(3), 415-427.
- Sánchez-Machado, D. I., Lopez-Cervantes, J., e Vázquez, N. R. (2006). High-performance liquid chromatography method to measure α - and γ -tocopherol in leaves, flowers and fresh beans from *Moringa oleifera*. *Journal of Chromatography A*, 1105(1), 111-114.
- Sangtarash, M. H., Qaderi, M. M., Chinnappa, C. C., e Reid, D. M. (2009). Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 212-219.
- Sarghein, S. H., Carapetian, J., e Khara, J. (2011). The effects of UV radiation on some structural and ultrastructural parameters in pepper (*Capsicum longum* A. DC.). *Turkish Journal of Biology*, 35(1), 69-77.

- Schuch, A. P., da Silva Galhardo, R., de Lima-Bessa, K. M., Schuch, N. J., e Menck, C. F. M. (2009). Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(1), 111-120.
- Schulze, E. D., Beck, E., e Muller-Hohenstein, K. (2005). Environment as stress factor: stress physiology of plants. *Plant Ecology*, 9(1), 7-11.
- Selvaraju, R., e Baas, S. (2007). Climate variability and change: adaptation to drought in Bangladesh: a resource book and training guide. *Food & Agriculture Organization of the United Nations*, 9(1), 1-56.
- Shanker, K., Gupta, M. M., Srivastava, S. K., Bawankule, D. U., Pal, A., e Khanuja, S. P. (2007). Determination of bioactive nitrile glycoside(s) in drumstick (*Moringa oleifera*) by reverse phase HPLC. *Food Chemistry*, 105(1), 376-382.
- Siddhuraju, P., e Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2144-2155.
- Silva, E. N., Ferreira-Silva, S. L., de Vasconcelos Fontenele, A., Ribeiro, R. V., Viégas, R. A., e Silveira, J. A. G. (2010). Photosynthetic changes and protective mechanisms against oxidative damage subjected to isolated and combined drought and heat stresses in *Jatropha curcas* plants. *Journal of Plant Physiology*, 167(14), 1157-1164.
- Silva, S., Pinto, G., Dias, M. C., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J., Pinto-Carnide, O., e Santos, C. (2012). Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54(1), 105-112.
- Silvestre, A. J., Cavaleiro, J. S., Delmond, B., Filliatre, C., e Bourgeois, G. (1997). Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*, 6(1), 27-33.
- Sims, D. A., e Gamon, J. A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment*, 81(2), 337-354.
- Skórska, E., e Szwarc, W. (2007). Influence of UV-B radiation on young triticale plants with different wax cover. *Biologia Plantarum*, 51(1), 189-192.
- Spinelli, F., Cellini, A., Piovene, C., Nagesh, K. M., e Marchetti, L. (2011). Emission and function of volatile organic compounds in response to abiotic stress. *INTECH Open Access Publisher*, 16(1), 365-394. ISBN: 9789533073941.
- Sreelatha, S., e Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303-311.
- Sunkar, R., Bartels, D., e Kirch, H. H. (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal*, 35(4), 452-464.
- Surabhi, G. K., Reddy, K. R., e Singh, S. K. (2009). Photosynthesis, fluorescence, shoot biomass and seed weight responses of three cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) cultivars with contrasting sensitivity to UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 160-171.
- Taiz, L. e Zeiger, E. (1998). Plant physiology. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, pp792. ISBN: 9780878938230
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., e Williams, S. E. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427(6970), 145-148.

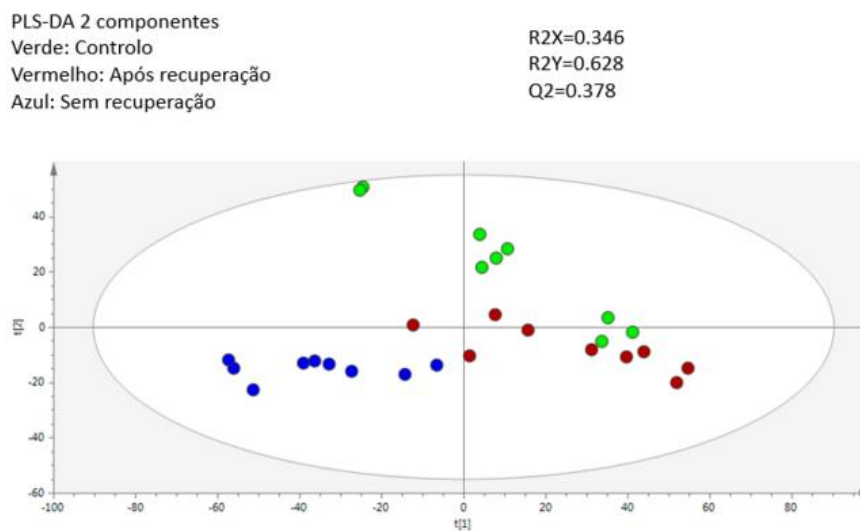
- Thuiller, W., Lavorel, S., Araújo, M. B., Sykes, M. T., e Prentice, I. C. (2005). Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(23), 8245-8250.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., e Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671-677.
- Tirado, M. C., Clarke, R., Jaykus, L. A., McQuatters-Gollop, A., e Frank, J. M. (2010). Climate change and food safety: A review. *Food Research International*, 43(7), 1745-1765.
- Tipler, A. (2013). An introduction to headspace sampling in gas chromatography – Fundamentals and theory. PerkinElmer, Inc. Waltham, Ma, USA. Disponível online, a 30/12/2015: http://www.perkinelmer.com/PDFs/downloads/GDE_Intro_to_Headspace.pdf
- Todaka, D., Shinozaki, K., e Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Recent advances in the dissection of drought-stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(1), 84.
- Turtola, S., Rousi, M., Pusenius, J., Yamaji, K., Heiska, S., Tirkkonen, V., ... e Julkunen-Tiitto, R. (2006). Genotypic variation in drought response of willows grown under ambient and enhanced UV-B radiation. *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 80-86.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., e Shinozaki, K. (2010). 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 132-138.
- Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., ... e Shinozaki, K. (2009). Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal*, 57(6), 1065-1078.
- US-EPA, (2010). Ozone layer depletion – Air and Radiation. EPA 430-F-10-027.
- Valente, A. L. P., e Augusto, F. (2000). Microextração por fase sólida. *Química Nova*, 23(4), 523-530.
- Van Lanen, H.A.J., Tallaksen, L.M. e Rees G. (2007). Droughts and climate change. In: Commission Staff Working Document Impact Assessment: Accompanying Document to Communication Addressing the Challenge of Water Scarcity and Droughts in the European Union. Commission of the European Communities, Brussels, Belgium.
- Vas, G., e Vekey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(3), 233-254.
- Vasques, A. R., Pinto, G., Dias, M. C., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J. M., Vallejo, V. R., e Keizer, J. J. (2015). Physiological response to drought in seedlings of *Pistacia lentiscus* (mastic tree). *New Forests*, 1-12.
- Vyas, S., e Kothari, S. K. S. (2015). Comparative analysis of phenolic contents and total antioxidant capacity of *Moringa oleifera* Lam.. *Pharmacognosy Journal*, 7(1), 44-51.
- Wadhwa, S. (2013). A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of *Moringa oleifera*. *Global Journal of Traditional Medicinal Systems*, 2(1), 1-13.
- WMO, (2005). Climate and land degradation. World Meteorological Organization, WMO-No. 989. ISBN 92-63-10989-3.
- Yao, Y., Xuan, Z., Li, Y., He, Y., Korpelainen, H., e Li, C. (2006). Effects of ultraviolet-B radiation on crop growth, development, yield and leaf pigment concentration of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) under field conditions. *European Journal of Agronomy*, 25(3), 215-222.
- Yordanov, I., Velikova, V., e Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38(2), 171-186.

Ziska, L. H., e Beggs, P. J. (2012). Anthropogenic climate change and allergen exposure: the role of plant biology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(1), 27-32.

COMPOSTO	CONTROLO	DS (1)	DS (11)
Açúcares			
D-Frutopiranoose	✓	✓	--
D-Talofuranose	✓	--	--
D-Psicose	✓	--	✓
β-D-Manopiranoose	✓	✓	--
β-D-Talopiranoose	✓	--	--
β-D-Xilopiranoose	✓	--	✓
β-D-Glucopiranoose	✓	--	--
D-Turanose	✓	✓	✓
Sucrose	✓	✓	✓
α-D-Alopiranoose	--	✓	✓
α-L-Galactofuranose	--	--	✓
Aminoácidos			
L-Valina	✓	✓	✓
L-Leucina	✓	--	✓
L-Serina	✓	✓	✓
L-Treonina	✓	✓	✓
L-5-Oxoprolina	✓	✓	✓
Fenilalanina	✓	✓	--
L-Asparagina	--	✓	--
L-Alanina	--	✓	--
L-Isoleucina	--	--	✓
Glicina	--	--	✓
Ácidos carboxílicos			
Ácido Benzenopropanóico	✓	--	--
Ácido Butanedióico	✓	✓	✓
Ácido Glicérico	✓	--	✓
Ácido Undecanóico	✓	✓	--
Ácido Málico	✓	--	--
Ácido Piroglutâmico	✓	--	--
Ácido 4-Aminobutanóico	✓	✓	✓
Ácido L-Treónico	✓	✓	✓
Ácido Etanosulfónico	✓	--	--
Ácido Cítrico	✓	✓	✓
Ácido Quínico	✓	✓	✓
Ácido Glucónico	✓	✓	✓
Ácido Ribónico	✓	--	✓
Ácido Palmítico	✓	--	✓
Ácido 9,12-Octadecadienóico	✓	✓	✓
Ácido α-Linolénico	✓	✓	✓
Ácido Esteárico	✓	✓	✓
Ácido Octadecanóico	✓	✓	--
Ácido Eicosanóico	--	✓	--
Ácido L-Aspártico	--	--	✓
Alcanos			
Docosano	✓	✓	--
Alcano 1	✓	✓	--
Tetrapentacontano	✓	✓	--
Alcano 2	✓	✓	--
Alcano 3	✓	✓	✓
Alcano 4	✓	✓	--
Alcano 5	✓	✓	--
Alcano 6	--	✓	--
Alcano 7	--	✓	--
Alcano 8	--	✓	--
Alcano 15	--	--	✓

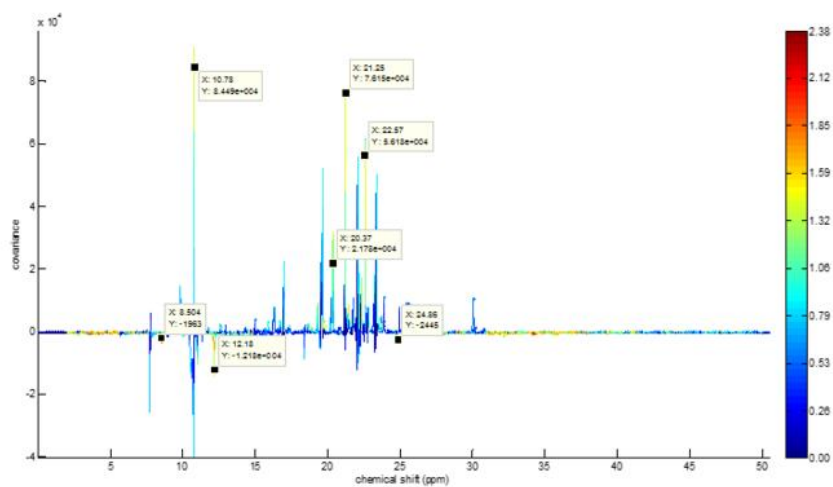
Álcoois			
Glicerol	✓	✓	✓
Mio-Inositol	✓	✓	✓
α-Tocoferol	✓	✓	--
1-Triacontanol	✓	✓	✓
Fitol	--	✓	--
2-Hexadecen-1-ol	--	✓	--
1-Octacosanol	--	✓	--
1,5-Anidrohexitol	--	--	✓
Álcool 1	--	--	✓
Esteróis			
Colest-5-en-3-ol	--	✓	--

Anexo 1 – Análise qualitativa para cada condição. Através da relação da área de cada composto com a área do padrão interno (A/A_{pi}) foi possível estimar a proporção de composto nos diferentes stresses.



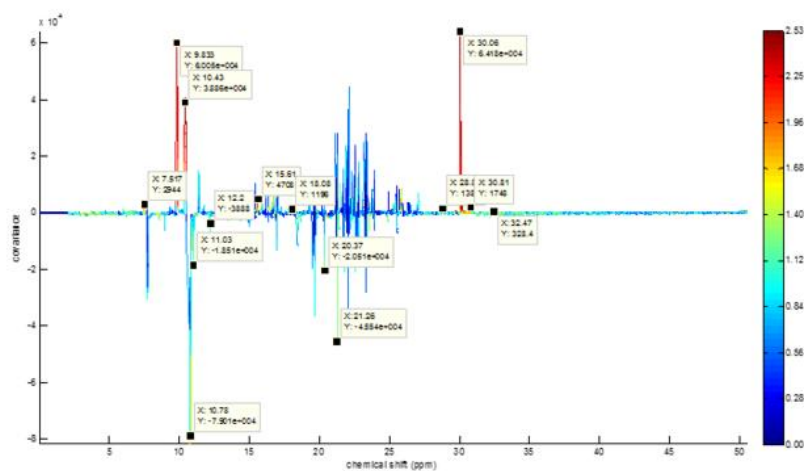
Anexo 2 – PLS-DA para 2 componentes

Loadings para componente 1 – ou seja separa os azuis (lado de baixo dos loadings) dos restantes VIP>1.06

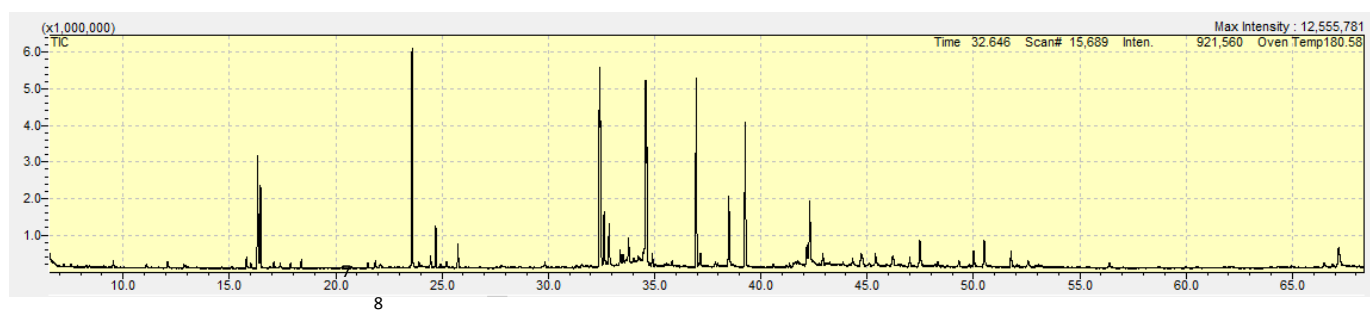


Anexo 3 – Loadings para componente 1

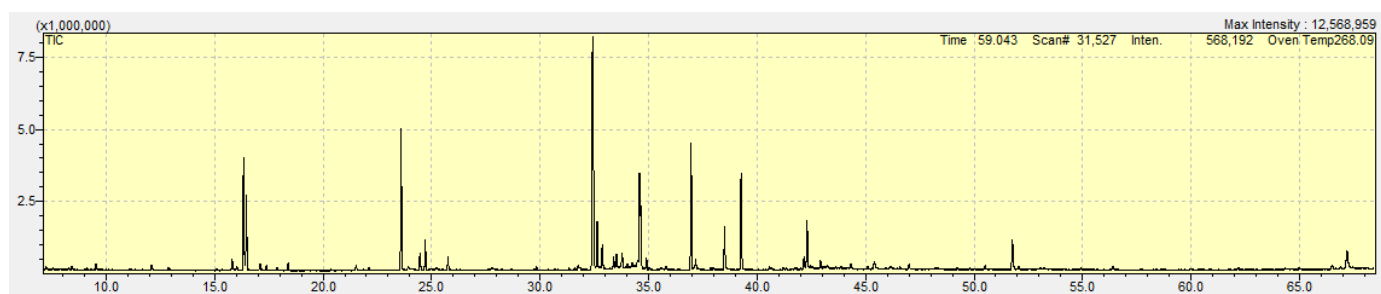
Loadings para componente 2 – ou seja separa os verdes (parte de cima dos loadings) dos restantes VIP>1.12



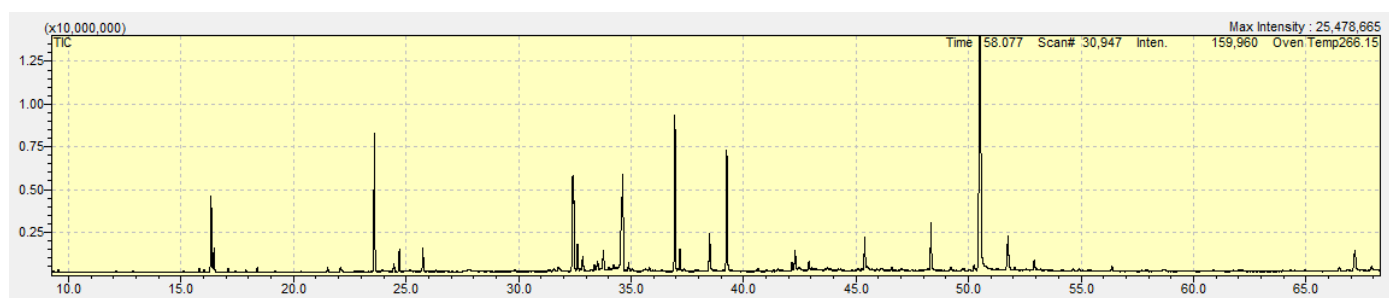
Anexo 4 – Loadings para componente 2



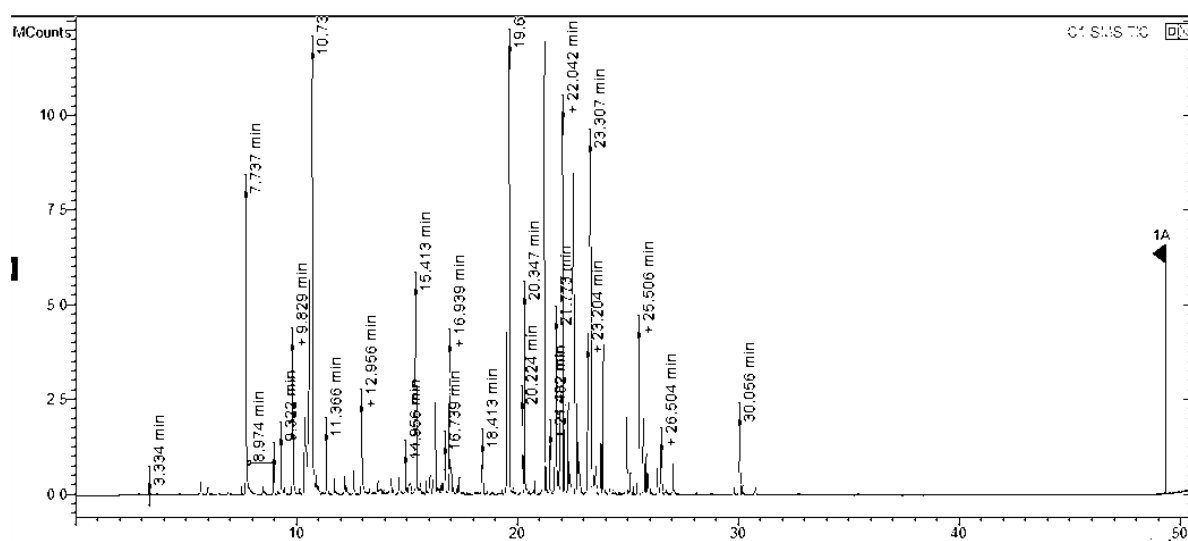
Anexo 5 – Cromatograma de um extrato de diclorometano sililado, injetado em GC/MS de uma amostra de controlo de *M. oleifera*.



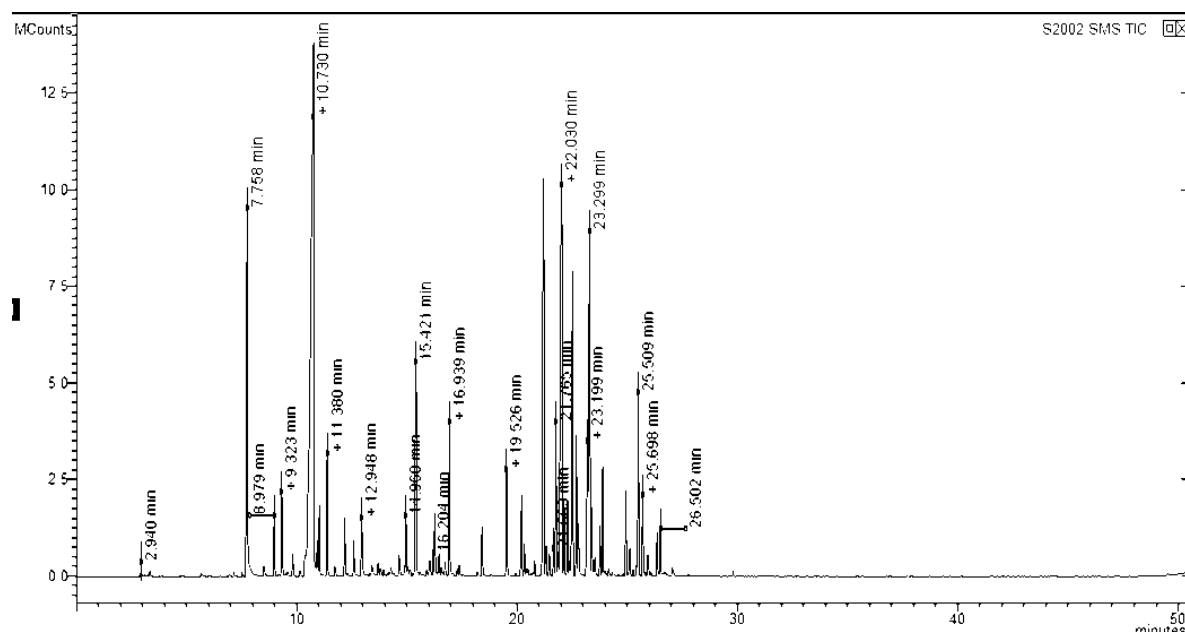
Anexo 6 – Cromatograma de um extrato de diclorometano sililado, injetado em GC/MS de uma amostra de DH (1) de *M. oleifera*.



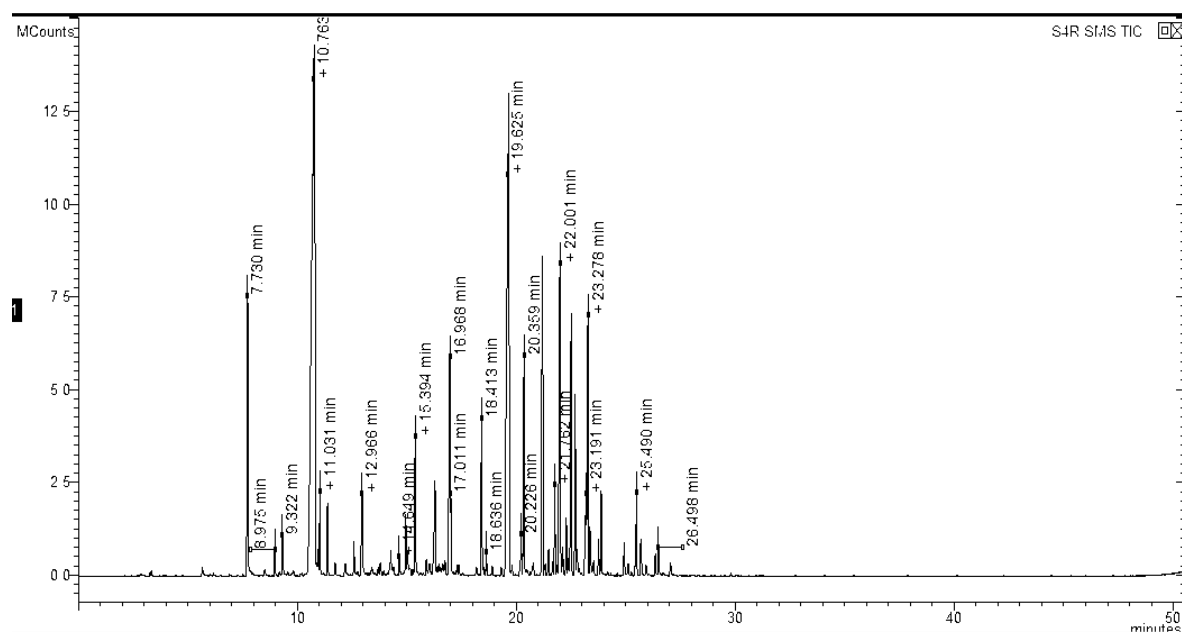
Anexo 7 – Cromatograma de um extrato de diclorometano sililado, injetado em GC/MS de uma amostra de DH (11) de *M. oleifera*.



Anexo 8 – Cromatograma da amostra de controlo de *E. globulus*



Anexo 9 – Cromatograma da amostra de S1 de *E. globulus*



Anexo 10 – Cromatograma da amostra de S11 de *E. globulus*

Ponto da reta (Tubo de sililação)	Álcool (µL)	Ácido gordo (µL)	Esterol (µL)	Alcano (µL)	Padrão Interno (µL)	CH ₂ Cl (µL)	Reagentes de Sililação (µL)	Volume final (µL)
1	500	1500	20	100	200	230	250+250+50	3200
2	100	2000	30	50	200	270	250+250+50	3200
3	1500	700	45	25	200	180	250+250+50	3200
4	2000	100	60	200	200	90	250+250+50	3200

Tabela A

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Maltose (mg)	0.052	0.778	2.080
Alanina (mg)	0.051	0.588	1.145

Tabela B

Anexo 11 – Quantidades usadas na preparação dos padrões. Foram preparados 4 tubos de sililação para cada padrão (Tabela A). Foram preparados 3 tubos de sililação para a maltose e a alanina (previamente pesadas) e foram adicionadas as mesmas quantidades de reagentes de sililação, padrão interno e 1.5 mL de CH₂Cl (Tabela B).

Pico	Tempo de Retenção	Pico	Tempo de Retenção
1	32.661	35	33.813
2	33.558	36	34.158
3	34.616	37	37.204
4	34.668	38	38.525
5	35.036	39	42.187

6	35.966	40	42.337
7	36.994	41	42.945
8	47.045	42	48.783
9	49.098	43	47.023
10	50.569	44	21.257
11	34.897	45	50.133
12	57.752	46	52.103
13	9.550	47	61.193
14	12.118	48	54.212
15	15.807	49	56.463
16	17.105	50	58.800
17	22.095	51	42.047
18	24.474	52	44.179
19	27.528	53	54.992
20	26.831	54	63.762
21	10.061	55	49.227
22	12.872	56	66.482
23	17.398	57	16.318
24	16.022	58	16.490
25	6.620	59	39.305
26	17.908	60	61.797
27	18.426	61	67.280
28	21.885	62	41.395
29	23.634	63	34.525
30	23.949	64	62.249
31	24.752	65	52.915
32	25.795	66	48.325
33	29.697	67	66.585
34	32.886		

Anexo 12 – Tempos de retenção dos picos identificados.

Amostra	Peso (g)			Amostra	Peso (g)		
C1	0.103	0.104	0.105	C1R	0.102	0.102	0.102
C2	0.104	0.101	0.105	C2R	0.104	0.106	0.105
C3	0.104	0.103	0.105	C3R	0.107	0.101	0.105
S1	0.103	0.104	0.102	S1R	0.105	0.106	0.105
S2	0.106	0.106	0.108	S2R	0.101	0.104	0.105
S3	0.102	0.104	0.103	S3R	0.105	0.106	0.103

Anexo 13 – Peso das folhas de *Eucalyptus globulus* distribuídas pelos vials. Cada amostra foi injetada em triplicado.